

湛江隐藻培养基的优化及其 N、P 和 K 含量与隐藻细胞颜色相关性的研究*

胡鸿钧 吴莉平

(中国科学院武汉植物研究所 武汉 430074)

提要 报道从广东湛江沿海采集、分离的隐藻——湛江隐藻 (*Cryptomonas zhanjiangensis* H. J. Hu et L. P. Wu) 的室内培养, 从 5 种培养基中筛选得到较适合于其生长的 85-1 培养基。在此基础上, 对培养基中的 N、P、K 含量在生长过程中的变化以及细胞中叶绿素和隐藻藻红蛋白的消长情况进行了研究。结果表明, 湛江隐藻在培养过程中出现的由红褐色—黄褐色—橄榄绿色的细胞颜色变化主要是由细胞内隐藻藻红蛋白与叶绿素的比值决定的, 并与培养基中 N 素水平的变化成正相关。此外, 在色素的提取过程中, 对同一材料的不同色素进行分步提取, 方法简便, 效果也较好。

关键词 隐藻, 培养基, 藻红蛋白, 色素

中图分类号 Q946

隐藻 (*Cryptomonas*) 是海洋第一性生产力的组成部分。已经分析过的隐藻不仅有较高的蛋白质含量, 而且某些种类 (如 *C. ovata* Ehrenberg 等) 还含有较丰富的不饱和脂肪酸, 特别是 DHA (C22:6), 含量达到总脂肪酸的 7% (陈峰等, 1999)。隐藻无纤维素的细胞壁易于消化吸收, 是鱼类及某些珍贵水产养殖动物的优良饵料之一 (Borowitzka *et al.*, 1988)。隐藻藻胆蛋白 (C-phycoobiliprotein) 是其光合作用的辅助色素。近年来, 藻蓝蛋白 (Phycocyanin) 和藻红蛋白 (Phycoerythrin) 作为荧光探针试剂在生物化学和医学研究中被广泛应用, 价格昂贵。据 Sigma 公司生化试剂目录标价, 藻红蛋白为 151.2—163.6 美元/mg, 由此可见隐藻的人工培养无论作为优良饵料还是作为提取藻红蛋白的原料, 其应用前景是广阔的。但是我国有关隐藻的研究却很少报道 (胡鸿钧, 1983; 胡鸿钧等, 1997; 施之新等, 1997)。隐藻资源的利用, 适宜培养基的筛选和培养条件的掌握是一个主要环节。人们在以往的研究中注意到, 不少隐藻在培养过程中常常出现由红褐色—黄褐色—橄榄绿色的颜色变化 (Ishimitsu *et al.*, 1984), 但对这种变化的起因并不清楚。虽然有关海水中营养盐与浮游植物生长的相关性以及营养盐对几种硅藻及氮磷组成的影响方面已有报道 (王勇等, 1999; 李铁等, 2000), 但对于 N、P、K 含量与隐藻细胞颜色相关性的研究却未见报道。作者对湛江隐藻的室内培养进行了研究, 并在获得较适合的培养基的基础上, 就其生长过

* 国家自然科学基金面上资助项目, 39870063 号; 国家自然科学基金重大项目, 39790110 号。胡鸿钧, 男, 出生于 1934 年 6 月, 研究员, Email: hongjun@rose.whiob.ac.cn

收稿日期: 2001-04-27, 收修改稿日期: 2001-11-12

程中培养基成分与几种色素量的消长关系进行了研究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

本实验所用材料为湛江隐藻 (*Cryptomonas zhanjiangensis* H. J. Hu et L. P. Wu), 采自广东省湛江海域硇州岛沿海礁石小水坑。

1.2 藻种的分离与培养

采用毛细管法分离纯化藻种, 置于 LRH-150-G 型恒温光照培养箱中培养。培养温度为 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光强为 2000—4000 lx, 光暗周期比为 13:11, 每日摇荡 3—4 次。

1.3 培养基组分的选择

主要为 1(85-1)、2(85-1)、3(f/2)、4(Er) 和 5(对照) 5 种培养基(表 1), 并通过比较培养, 从中筛选出适于湛江隐藻生长的培养基配方。

1.4 生长速率的测算

采用细胞计数法(薛应龙, 1985)。每次按同等条件接种 3 瓶作平行实验, 接种后当即用血球计数板和计数器在显微镜下测算出每毫升培养液中细胞密度, 以后每隔 24 h 测算一次, 连续观测两周。细胞数目的测算, 每个样品测 6 次后取平均值, 生长曲线和细胞分裂率曲线按 3 个平行样品的平均值绘制。

K 值按下列公式计算(Robert *et al*, 1979):

$$K = \lg(N_{t_2}/N_{t_1}) / (t_2 - t_1) \lg 2$$

式中, K 为细胞分裂率; N_{t_1} 为 t_1 天的细胞数; N_{t_2} 为 t_2 天的细胞数。

1.5 叶绿素含量和隐藻藻红蛋白的测定

取一定体积的不同时期的细胞培养物, 离心收集细胞, 分步提取叶绿素和隐藻藻红蛋白。先用改良的 Bogorad(1962)的方法提取细胞中的叶绿素, 经硅胶柱 ($D \times L = 1.5 \times 6$) 层析分离纯化, 石油醚萃取, 挥发干燥。然后, 用提取叶绿素后的细胞直接用于隐藻藻红蛋白的提取, 按文献(Allen *et al*, 1959; O HEocha *et al*, 1959; Swingle *et al*, 1951)等方法做适当修改。提取的隐藻藻红蛋白经 G-75 葡聚糖凝胶 ($D \times L = 1 \times 10$) 层析分离纯化(Melachlan, 1979), 冷冻真空干燥。色素的相对含量采用 72-1 型分光光度计定量测定。

1.6 培养基中 N、P、K 含量的定量分析

P、K 含量分析, 取培养 15 天和 25 天后藻细胞分别为红褐色或者橄榄绿色的培养液, 经双层滤纸过滤, 取滤液用等离子光谱测定(仪器型号: IR1S Advantage TGA solution)。N 含量测定用蒸馏滴定法(国标 GB1189-89), 上述分析测定均由湖北省农业科学院测试中心完成。

1.7 蛋白质含量测定

采用 Bradford(1976)法测定。

2 实验结果

2.1 湛江隐藻的室内培养

用 5 种不同的培养基对湛江隐藻进行培养, 在温度、光强和光暗周期相同的条件下, 对其生长速率、细胞颜色和储存物质淀粉等进行观察。结果表明, 85-1 培养基较适宜于湛

江隐藻生长(图 1),培养 10 天后,除细胞颜色的差异外,淀粉的储存量明显高于其它几种培养基中的细胞,培养液中最大细胞密度也为其它几种培养基的 3 倍左右(表 1)。

表 1 湛江隐藻在不同培养基中的生长情况

Tab.1 The growth of *C. zhanjiangensis* in various medium

| 项目 | 培养基 | | | | |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 1(85-1) | 2(85-1) | 3(f/2) | 4(Er) | 5(对照) |
| 培 NaNO ₃ (mg/L) | 170 | 170 | 66 | 170 | — |
| 养 Na ₂ HPO ₃ (mg/L) | — | 50 | 75 | 50 | — |
| 基 K ₂ HPO ₃ (mg/L) | 40 | 40 | — | — | 40 |
| 成 甘油磷酸钠(mg/L) | 40 | 40 | — | — | 40 |
| 分 海泥浸提液(ml/L) | 50 | 50 | f/2 微量金属液 1ml | 50 | 50 |
| VB ₁ (μg/L) | 1 | 1 | 100 | — | 1 |
| VB ₁₂ (μg/L) | 1 | 1 | 0.5 | — | 1 |
| Biotin(μg/L) | 1 | 1 | 0.6 | — | 1 |
| 蒸馏水(ml/L) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| 海水(ml/L) | 750 | 750 | 750 | 750 | 750 |
| 观 接种时细胞密度(ind/ml) | 4.4 × 10 ⁵ | 4.6 × 10 ⁵ | 4.3 × 10 ⁵ | 4.0 × 10 ⁵ | 4.5 × 10 ⁵ |
| 察 接种时培养液颜色 | 浅褐色 | 浅褐色 | 浅棕色 | 浅棕色 | 浅棕色 |
| 项 10 天后培养液颜色 | 前褐红色 | 褐红色 | 棕红色 | 棕红色 | 棕红色 |
| 目 10 天后淀粉相对含量 | +++ | ++ | ++ | ++ | + |
| 最大细胞密度(ind/ml) | 9.92 × 10 ⁷ | 3.20 × 10 ⁷ | 3.42 × 10 ⁷ | 3.14 × 10 ⁷ | 3.10 × 10 ⁷ |

用 85-1 培养基,细胞通常在接种后的 3—4 天进入对数生长期。对数生长期一般可维持 1 周左右(图 2)。

在此期间,细胞的平均分裂率约为 1.1(图 3)。对数生长期的细胞培养液每 4h 取样 1 次,连续取样 60h 进行细胞计数。结果表明,用 85-1 培养基培养的细胞,在 13:11 的光暗周期,(20 ± 1)℃ 及 4000 lx 的培养条件下,能在光暗周期后半段得到较多的分裂细胞,且相当数量的细胞分裂发生在 12:00—16:00 之间,而在暗周期内仅有少数细胞分裂(图 4)。

2.2 培养过程中培养基成分与几种光合色素的消长关系

在培养过程中发现,湛江隐藻细胞可呈现出红褐色、黄褐色或橄榄绿三种不同的颜色。这种颜色的变化与光强和培养温度的关系不大。当光强和培养温

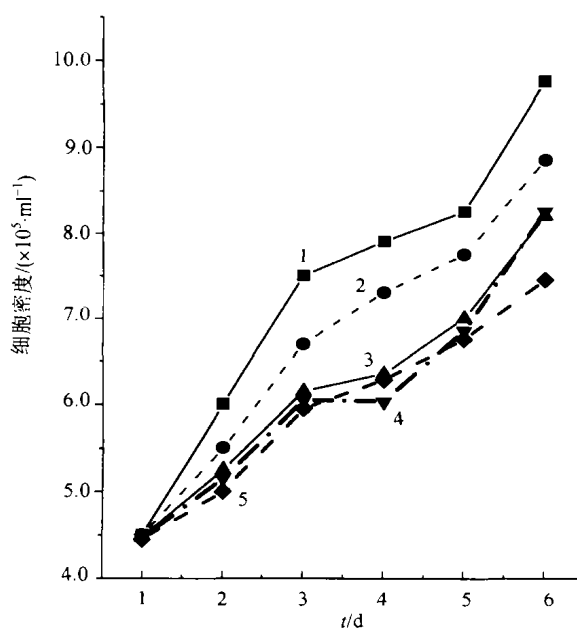


图 1 湛江隐藻在 5 种培养基中的生长速率

Fig.1 The growth rate of *C. zhanjiangensis* in 5 different media

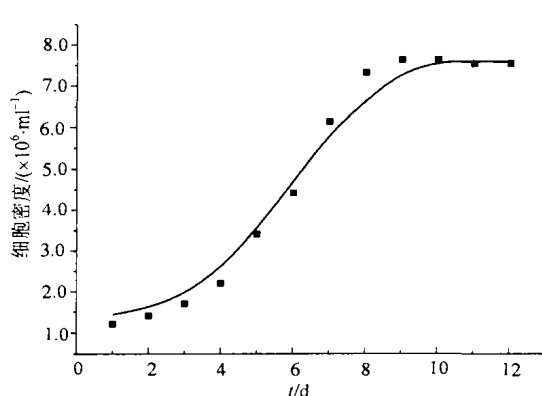


图 2 湛江隐藻的生长曲线

Fig.2 The growth curve of *C. zhanjiangensis*

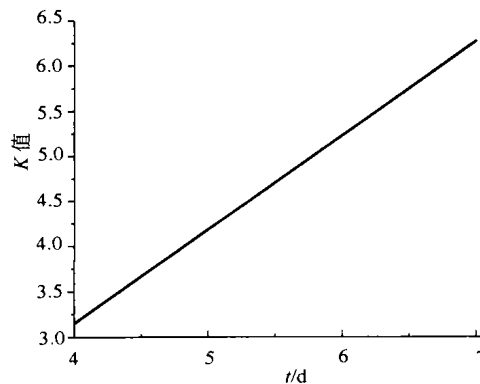


图 3 湛江隐藻对数生长期平均细胞分裂率

Fig.3 The average rate of cell division of *C. zhanjiangensis* in exponential-phase growth

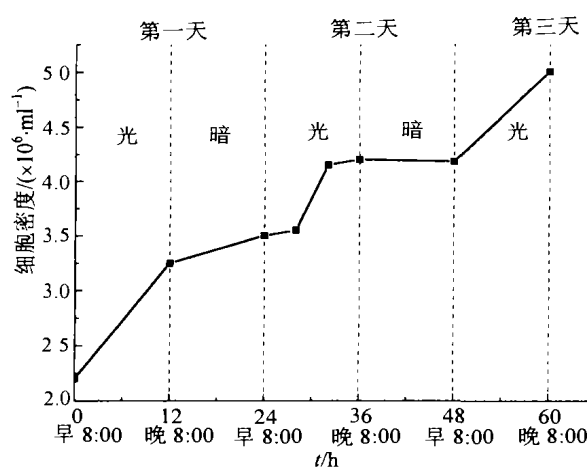


图 4 湛江隐藻的细胞周期

Fig.4 The cell cycle of *C. zhanjiangensis*

度一定时,无论用何种颜色的细胞接种,接种后的细胞总是最初呈现红褐色,然后转变成黄褐色,最后成为橄榄绿色。色素提取和分离的结果表明:上述三种颜色的细胞的 90% 丙酮:甲醇(5:1)提取液,都分别在 460nm、630nm 和 663nm 显示 3 个吸收峰,它们分别为 α -胡萝卜素、叶绿素 c 和叶绿素 a;而这三种颜色的细胞的磷酸盐缓冲液提取液都仅在 555nm 处有一个吸收峰,为隐藻藻红蛋白。这 4 种色素的含量,在 3 种颜色的细胞中各不相同,但总趋势是叶绿素 a 和隐藻藻红蛋白的含量在 3 种不同颜色的细胞中都较高。本研究分别在细胞呈红褐色、橄榄绿这两个培养时期取样,测定了其细胞内叶绿素 a

和隐藻藻红蛋白的含量,并定量分析了这两个时期内培养基中 N、P、K 的含量,结果列于表 2。

表 2 不同培养时期细胞内叶绿素 a 和隐藻藻红蛋白及培养基中 N、P、K 的含量

Tab.2 Contents of chlorophyll-a, K-phycoerythrin and N, P and K in media at various stages

| 样品 | 培养时间(d) | 细胞颜色 | 叶绿素 a 含量 (OD_{670}) | 隐藻藻红蛋白 (OD_{555}) | 培养液中 N、P、K 的含量 | | |
|----|---------|------|-------------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | | | | N(mg/ml) | P(μ g/ml) | K(μ g/ml) |
| 1 | 15 | 红褐色 | 0.84 | 0.51 | 8.59 | 96.5 | 385 |
| 2 | 25 | 橄榄绿色 | 0.82 | 0.22 | 3.02 | 91.9 | 374 |

2.3 湛江隐藻的蛋白质含量

用离心方法获得的藻泥,经过干燥成为藻粉,干藻粉粗蛋白含量为 38.91%。

3 讨论

开始探索湛江隐藻的培养条件时,作者采用了 5 种不同的培养基进行实验。在接种量、光强、培养温度及光暗周期相同的情况下,隐藻细胞在 85-1 培养基中生长的速率明显高于其它几种培养基中生长的速率。每毫升培养物中最高细胞密度也高出其它 4 种 3 倍左右。85-1 培养基是由作者自己设计配制的,实际上它与 2(85-1)、f/2 和 Er 培养基的营养成分大致相似,除各成分的含量稍有差别外,主要是用 K_2HPO_4 替代了 Na_2HPO_4 ,并增加了适量的甘油磷酸钠。作者所用的 5 种培养基都是海水培养基,海水中高浓度的 Na^+ 对细胞的生长不但意义不大,还可能有抑制作用。相反,海水中 K^+ 的浓度比 Na^+ 低得多,补充适量的 K^+ ,可以调节培养基中 K^+ 与 Na^+ 的平衡,有利于细胞对 N 素的吸收和光合产物的转运,对细胞的代谢调节也有促进作用。

85-1 培养基与 5 号培养基基本相同,差别仅在于前者加入了 $170mg/L NaNO_3$,而后者没有。因此,这两种培养基的 N 素水平是有明显差异的。用这两种培养基培养的细胞,除表现出生长速率的明显差异外,细胞颜色的变化也明显不同。培养 7—10 天后,85-1 培养基中的细胞仍为红褐色,而 5 号培养基中的细胞却已经变成橄榄绿色。在实验中还注意到,即使是用同一种培养基培养的细胞,随着培养时间的延长,也会呈现出红褐色、黄褐色和橄榄绿色的不同颜色。由此推测,这种细胞颜色的变化很可能与培养基中的 N 素水平有关。

实验结果与作者的推测相一致。在培养前期(细胞红褐色)和培养后期(细胞橄榄绿色),培养液中 P 和 K 的含量变化不大(一般只有数 mg 之差),但 N 的含量变化却十分明显。前期培养液中 N 含量比后期高出 $5.574mg/mL$ 。细胞中叶绿素 *a* 的相对含量从培养前期的红褐色细胞到后期的橄榄绿色细胞,变化不大;而隐藻藻红蛋白的相对含量则由前期的 $0.51(OD_{555})$ 下降到后期的 $0.22(OD_{555})$ 。

湛江隐藻的色素体中含有叶绿素 *a* 和 *c*、 α -胡萝卜素,叶黄素和隐藻藻红蛋白。其中,叶绿素和隐藻藻红蛋白都是含 N 色素,它们的合成依赖于 N 素,而 α -胡萝卜素则是非含 N 色素(Lee, 1980)。根据实验结果,N 素水平的改变首先影响隐藻藻红蛋白的合成量。因此,培养基中较高的 N 素水平可能比较有利于维持相对较高的隐藻藻红蛋白与叶绿素比值,使细胞呈红褐色;而较低的 N 素则可能有利于维持较低的隐藻藻红蛋白与叶绿素比值,细胞呈橄榄绿色;当这一比值适中时,综合其它色素的作用,则隐藻细胞呈黄褐色。隐藻在自然水体中(海洋、湖泊、池塘等),当环境条件适宜时可以大量繁殖形成水华,1986 年在我国长江口外海就发生过隐藻水华,面积约为 $300km^2$ (齐雨藻, 1999);1997—1999 年在香港海域也发生过数次隐藻水华。虽然现在尚未见隐藻分泌毒素的报道,但隐藻水华的出现、藻细胞的大量死亡对海水环境及沿岸海产养殖业将会产生不良影响。赤潮(包括隐藻水华)的形成机理现在尚不甚清楚,本项研究可能对探索隐藻水华的发生机理有一定的参考意义。

用 85-1 培养基和 5 号培养基培养的细胞,淀粉储存量也有较明显的差异,在前者中生长的细胞比在后者中生长的细胞淀粉储存量高得多。实际上,这一结果与上述这两种培养基中的细胞在色素合成量上的差异是相关的。在 85-1 培养基中生长的细胞,显然含有更多的隐藻藻红蛋白,而隐藻藻红蛋白作为一种光合作用的辅助色素,能有效地吸收光

能并传递给叶绿素 *a* (Mclachlan, 1979; Haxo *et al.*, 1959)。这对于光能的吸收利用,以至细胞中更多光合产物的形成是有利的。

色素的提取,按以往的方法,叶绿素、 α -胡萝卜素和隐藻藻红蛋白的提取是分别取材进行的,而且隐藻藻红蛋白的提取通常需先用超声波或者通过反复冷冻、解冻的方法破碎细胞。作者在实验中对同一批材料采取分步提取的方法,先用有机溶剂提取细胞中的叶绿素和 α -胡萝卜素,提取这两类色素后的细胞又直接用于隐藻藻红蛋白的提取。由于有机溶剂的提取作用,质膜的通透性发生改变,可省去以往隐藻藻红蛋白提取之前的细胞破碎过程,方法简便,而且色素提取的效果也很好。

除叶绿素和 α -胡萝卜素外,湛江隐藻(干藻粉粗品)中还含有 38.91% 的蛋白质。如果进一步提高培养和采收质量,估计蛋白质含量还有提高。这就有可能提高分级处理来获得不同色素和蛋白质产品,使隐藻资源得到综合利用。

参 考 文 献

- 王 勇,焦念志,1999. 北黄海浮游植物营养盐限制的初步研究. 海洋与湖沼, 30(5):512—518
- 齐雨藻主编,1999. 赤潮. 广州:广东科技出版社, 26
- 李 铁,胡立阁,史致丽,2000. 营养盐对中肋骨条藻和新月菱形藻生长及氮磷组成的影响. 海洋与湖沼, 31(1): 46—52
- 陈 峰,姜 悦主编,1999. 微藻生物技术. 北京:中国轻工业出版社, 220—221
- 胡鸿钧,1983. 一种海生隐藻光合色素的初步分析. 见:中国第一届藻类学术讨论会论文集, 12
- 胡鸿钧,施之新,魏印新,1997. 具尾蓝隐藻(*Chroomonas caudate* Geitler)的研究. I. 形态特征——光镜及扫描电镜观察. 武汉植物学研究, 15(3): 215—217
- 施之新,魏印新,胡鸿钧,1997. 具尾蓝隐藻(*Chroomonas caudate* Geitler)的研究. II. 藻蓝蛋白(phycoyanin)的初步研究. 武汉植物学研究, 15(4): 328—330
- 薛应龙主编,1985. 植物生理学实验手册. 上海:上海科学技术出版社, 52
- Allen M B, Dongherty E C, Melanghin J A, 1959. Photoreactive pigments in flagellate-Chromoprotein pigment of some *Cryptomonas* flagellates. *Nature*, 184: 1047
- Bogorad L, 1962. Chlorophylls. In: Lewin R E ed. *Physiology and Biochemistry of Algae*. New York: Academic Press Inc., 390—391
- Borowitzka M A, Borowitzka L J, 1988. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 197—213
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248—254
- Haxo F T, Fork D C, 1959. Photosynthetically active pigment of *Cryptomonas*. *Nature*, 184: 1051—1052
- Ishimitsu M, Chihara M, 1984. Four species of *Cryptomonas* (Class Cryptophyceae) in Japan. *J Jap Bot*, 59: 161—169
- Lee R E, 1980. *Phycology*. Cambridge: Cambridge University Press, 126—134
- Mclachlan J, 1979. Growth Media——Marine. In: Stein R ed. *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge: Cambridge University Press, 25—52
- O HEocha C, Raftery M, 1959. Phycoerythrins and Phycocyanins of *Cryptomonas*. *Nature*, 184: 1049—1051
- Robert R L, Guillar D, 1979. Division Rates. In: Stein R ed. *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge: Cambridge University Press, 289—311
- Swingle S M, Tiselius A, 1951. Tricacium phosphate as an adsorbent in the chromatography of proteins. *Biochem J*, 84: 71

**OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIUM FOR *CRYPTOMONAS*
ZHANJIANGENSIS AND CORRELATION OF N, P AND K CONTENTS IN
OPTIMIZED MEDIUM WITH *CRYPTOMONAS* CELL COLORS**

HU Hong-Jun, WU Li-Ping

(*Wuhan Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430074*)

Abstract *Cryptomonas zhanjiangensis* H. J. Hu et L. P. Wu was collected and isolated from the coast of Zhanjiang, Guangdong Province. This paper reports its culture in our laboratory. The medium 85-1 selected among 5 different media is amenable to the growth of *C. zhanjiangensis*. The contents of inorganic ions (N, P and K) in the medium and of chlorophyll-*a* and phycoerythrin of *C. zhanjiangensis* cells from mahogany, snuff color to olive during culture, and these difference depended on the ratio of phycoerythrin to chlorophyll-*a*, which was positively interrelated to the levels of nitrogen resource in the medium. In addition, an improved method was used to extract pigments from *Cryptomonas* cells and it was proven to be useful for determination of pigments and proteins of *Cryptomonas* cells.

Key words *Cryptomonas*, Media, Phycoerythrin, Pigment