

稻田鱼腥藻空间搭载与回复搭载 克隆株间代谢特性的比较研究*

胡章立 刘永定

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要

本文对具有高固氮酶活性空间返地单克隆株(AoSR16)、回复搭载返地克隆株(AoSR16—17)与原始出发株间的代谢特性进行了比较分析。结果表明,三者在生长特性、光合和呼吸活性、固氮酶活性、藻胆蛋白累积与氨分泌等方面均表现出不同程度的差异。空间环境导致的稻田鱼腥藻代谢变化是藻类对空间环境的一种适应形式。同时,我们发现空间飞行导致的高固氮酶活性藻株经地面保持培养后表现出二种不同的效应,即可回复的表型效应和可遗传的稳定效应。

关键词 稻田鱼腥藻 — 代谢 — 性状分离 — 空间环境

1 引言

由于微藻具有生长快、光合利用率高、营养组份齐全及可以进行集约化培养等诸多适应于空间研究与应用的特性,使其在空间生物学效应研究中显得独具特色。通过对稻田鱼腥藻(*Anabaena oryza* HB23)的空间搭载实验,出现了具有高固氮酶活性克隆株-AoSR16^[1]等3种类型的性状分离,对AoSR16进行回复搭载并进行返地样品单克隆分离,得到了AoSR16—17等一批单克隆藻株,作者已先后报道了AoSR16、AoSR16—17和原始出发株3个品系的空间生存与适应以及遗传特性等方面的研究结果^[2,3],本文就三者代谢方面的特性进行比较分析。

2 材料与方方法

藻种 稻田鱼腥藻(*Anabaena oryza* HB23)由中国典型培养物保藏中心中国淡水藻种库(FACHB,中国科学院水生生物研究所)提供。AoSR16品系: *Anabaena oryza* HB23通过空间飞行8天后返回地面,在实验室进行单克隆分离筛选得到的1株具有高固氮活性的藻株^[1]。AoSR16—17品系: AoSR16经返回式科学卫星进行回复搭载后,得到的具有高固氮酶活性的返地单克隆株。

* 国家载人航天工程资助项目

液体通气培养 将藻种接种于盛有藻类培养基的培养管(200 mL)内,在光强 $36 \mu\text{E}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光周期 12:12 h(L:D),温度 28°C ,以及通气量(过滤空气)0.05 L/min 条件下进行培养。

固体琼脂培养 将藻种接种在琼脂斜面培养基上,在藻种保藏室内保存,一般一个月左右重新接种一次。AoSR16 及 AoSR16—17 的地面保持培养即采用此方式。

固氮酶活性测定 采用乙炔还原法测定。具体步骤如下:取藻液 2 mL,放入 6.3 mL 的反应瓶中,盖上反耳塞,在真空泵下抽气充氩 3 次。放平压后,加入 0.8 mL C_2H_2 ,置瓦氏呼吸仪下摇动保温,摇动频率为 60 min^{-1} ,温度为 30°C ,光照 $52 \mu\text{E}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。30 min 后终止反应。形成的乙烯在上海分析仪器厂 103 型气相色谱仪上测定。

藻胆蛋白含量测定 采用 Siegelman 等^[6]的方法测定。取 5 mL 的藻液用超声波打破细胞(镜检),然后置于 7000 g 离心 15 min,弃残渣得到粗提液。然后分别于上海分析仪器厂 752 型分光光度计在 615 nm、652 nm 和 562 nm 处比色,并根据其公式计算出藻胆蛋白总量(mg/mL)。

氨排出测定 采用 Solotzano 等^[7]的方法并稍加修改。取 5 mL 藻液,离心后取上清液加入 0.2 mL 酚试剂、0.2 mL 0.5% 的硝普酸钠和 0.5 mL 氧化液(100 mL 柠檬酸钠溶液和 25 mL 1.5 N 次氯酸溶液混合均匀,当天配制)混合。其中,柠檬酸钠溶液由 100 g 柠檬酸钠和 5 g 氢氧化钠溶于 500 mL 水中配制而成。反应混合液在室温($22\text{--}27^\circ\text{C}$)放置 1 h,在 752 型分光光度计于 640 nm 处的比色,根据标准曲线计算出氨量。

叶绿素含量测量 采用 Arnon 等^[4]的方法测定。取 5 mL 藻液离心后弃去上清液,并将沉淀的藻细胞用 5 mL 80% 的丙酮重新悬浮,并在黑暗处抽提 24 h 后,用上海分析仪器厂 752 型分光光度计测定 OD_{663} 值,并根据公式:叶绿素含量(mg/mL) = $\text{OD}_{663}/82.04$ 计算出测定结果。

光合放氧及呼吸耗氧速率测定 采用 Hansatech Clark 型(DW1, U.K.)溶氧测定仪测定藻细胞光合放氧速率。测定仪预热 30 min 后,测定氧标准曲线。然后,取 2 mL 藻液放入反应室,稳定 2 min,通入氮气赶走大部分溶氧。盖上反应室盖,开始测定。放氧稳定后记录放氧不少于 5 min,并根据藻的生物量计算出藻细胞光合放氧速率。

同样采用 Hansatech Clark 型溶氧测定仪测定藻细胞的呼吸耗氧速率。具体步骤如下:测定仪预热 30 min 后,测定氧标准曲线。取藻液 2 mL,放入反应室并保持黑暗,稳定 2 min 后,记录耗氧量,根据藻生物量计算出藻细胞耗氧速率。

光合荧光效率测定 使用 Hansatech MK2 型植物光合效率分析仪(PEA)测定藻细胞光合色素荧光的初始值 F_0 、最大值 F_m 和可变值 F_v ,以其最大荧光和可变荧光的比值表示藻细胞的光合效率。

3 结 果

3.1 不同品系稻田鱼腥藻生长特性比较

将出发株(*Anabaena oryza* HB23)、返地克隆株(AoSR16)及回复再搭载返地克隆株(AoSR16—17)在地面实验室条件下扩大培养后测定其生长速率。接种后第 1—8 天的平

均生长速率, 稻田鱼腥藻搭载株与地面对照之间没有显著的差异(表 1), 但它们的最大生长速率是有差异的, 出发株的 $\mu_{\max}=0.556 \text{ d}^{-1}$, 在接种后第 2—3 天出现; AoSR16 的 $\mu_{\max}=0.723 \text{ d}^{-1}$, 在接种后第 1—2 天出现; AoSR16—17 的 $\mu_{\max}=0.935 \text{ d}^{-1}$, 在培养第 6—7 天出现(表 1).

表 1 稻田鱼腥藻不同品系生长特性间的比较

品系	平均生长速率 μ_a (d^{-1})	最大生长速率 μ_{\max} (d^{-1})
<i>Anabana oryza</i> HB23	0.245± 0.012	0.556± 0.023
AoSR16	0.230± 0.011	0.723± 0.433
AoSR16—17	0.249± 0.009	0.935± 0.051

3.2 固氮酶活性

稻田鱼腥藻是一种丝状固氮蓝藻, 固氮酶活性是其重要生理特性之一. 通过对空间飞行返地后单克隆藻株的固氮酶活力分析发现, 其固氮酶活性与地面对照株比较出现了明显的分离. 从表 2 可以看出, 空间飞行后的返地克隆株 AoSR16 及具有高固氮酶活性的回复再搭载返地单克隆株 AoSR16—17 的固氮酶活性均远远高于初始出发株. 经地面保持培养数年后, 发现有的藻株(A类)(AoSR16 和 AoSR16—17 等)固氮酶活性仍明显高于初始出发株, 说明这种空间环境导致的性状分离是稳定的; 有的藻株(B类)(AoSR16—32 等)固氮酶活性则随保存时间的延长而逐渐恢复到初始出发株的水平 ($133.18 \text{ nmol C}_2\text{H}_2/\text{mg Chl}\cdot\text{min}$ (表 2), 说明这种性状分离是可恢复的表型效应.

表 2 高固氮酶活性的 AoSR16 回复搭载返地克隆株固氮酶活性的稳定性

藻株类型	返地时固氮酶比活性	两年后固氮酶比活性
	$\text{nmol C}_2\text{H}_2/\text{mg Chl}\cdot\text{min}$	$\text{nmol C}_2\text{H}_2/\text{mg Chl}\cdot\text{min}$
A 类 (AoSR16—17 等)	431.70± 10.28	385.80± 23.14
B 类 (AoSR16—32 等)	401.27± 14.04	177.20± 10.63

3.3 光合活性与呼吸活性的变化

表 3 稻田鱼腥藻及其返地单克隆株的光合与呼吸活性

藻株类型	光合放氧速率	呼吸耗氧速率	光合荧光效率
	$\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$	$\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$	(F_v/F_m)
Original strain	2.200±0.038	0.725±0.04	0.360±0.006
AoSR16	2.130± 0.045	0.708± 0.022	0.349±0.013
AoSR16—17	2.140± 0.035	0.710± 0.028	0.350±0.014

从表 3 可以看出, 一次或两次空间飞行后返地的单克隆株, 其光合放氧速率和呼吸耗

氧速率以及藻体的光合荧光效率均非常相似, 且均较地面对照株稍低. 这说明高固氮酶活性克隆株的固氮并不与其光合与呼吸平行. 同时, 也说明上天株固氮酶活性的提高, 可能不是由于 ATP 和 NADPH 供应增加的原因.

3.4 藻胆蛋白含量及 NH_4^+ 排出的差异

在培养的前 3 天, 初始出发株、AoSR16 及 AoSR16—17 藻胆蛋白含量没有明显的

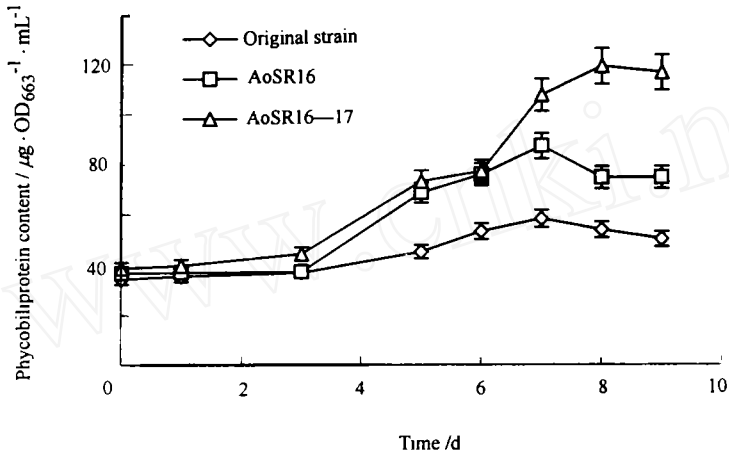


图 1 稻田鱼腥藻及其返地单克隆株藻胆蛋白含量差异

Fig.1 The content variations of phycobiliprotein between the original and the retrieved momoclonal strains of *Anabaena oryza*

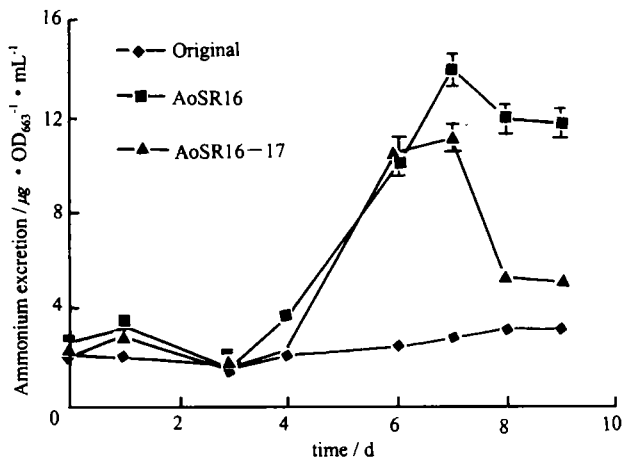


图 2 稻田鱼腥藻及其返地单克隆株氨排出量的差异

Fig.2 The variations of the ammonium excretion between the original and the retrieved momoclonal strains of *Anabaena oryza*

差异,而在第3天以后, AoSR16 以及 AoSR16—17 藻胆蛋白含量明显高于初始出发株. 而 AoSR16 与 AoSR16—17 比较, 其中第0—6天的差异较小, 第6—9天 AoSR16—17 藻胆蛋白含量大于 AoSR16(图1).

在整个培养周期, 初始出发株与 AoSR16 及 AoSR16—17 之间在氨排出量上有明显的差异. 初始出发株的排氨量很低, 且在0—9天的通气培养期内没有多少变化; 而 AoSR16 和 AoSR16—17 在培养第3天以后, 培养物向培养基中释放氨, 而第7天左右, 藻细胞排氨量达到峰值, 随后则下降(图2).

从天株与初始出发株间藻胆蛋白累积与氨的排出情况来看, 高固氮酶活性单克隆株固定的氮除了供应其正常的生长需求外, 有两个可能的去向, 一个是作为藻胆蛋白累积在藻细胞内, 另一个则以氨的形式排出体外.

4 讨 论

从稻田鱼腥藻返地克隆株及其回复再搭载克隆株与野生株氮代谢的比较分析中, 我们可以看出, 氮代谢的变化一方面是可逆的生理适应过程, 即藻类进入太空后, 由于样品盒内的氮源是有限的, 随着藻固氮作用的不断进行, 特别是封闭培养盒内气体组分相对比例的非平衡变化, 其中游离氮的浓度不断下降, 使之逐渐成为藻细胞生长的限制因子, 此时藻类细胞只有在具有高固氮酶活性的情况下, 才能在一定时间内固定足够的氮以供其生长、发育等的基本需要, 从而逐渐地成为了一种生理性的适应反应. 而这种适应在环境中氮源恢复到正常后会逐渐得到恢复, 我们从第一次空间搭载活动的克隆藻株的进一步分析中发现, 有的高固氮酶活性克隆株逐渐恢复到了原始株的固氮酶活性水平^[1,5]. 另一方面, 由于空间环境中存在导致藻细胞性状发生可遗传分离的因素, 这些因素可能诱发藻细胞有关的基因发生变化, 使之出现了低或高固氮酶活性的变异株, 显然, 在空间氮源成为限制因素的环境中, 低固氮酶活性的变异株是不适于环境而被抑制甚至死亡, 这在本试验的第一次空间搭载及回复搭载的返地单克隆分离时出现了这种情况. 而高固氮酶活性的变异株则因适应于空间环境而很好地生存下来.

在地面培养时, AoSR16 和 AoSR16—17 的光合活性和呼吸活性与出发株间没有明显的差异, 这说明固氮酶活性的提高不是由于 ATP 供应增强, 也排除 NADPH 供应增加的原因, 可能是与固氮有关的基因发生了变异, 作者在 RAPD 分析中已经发现了多态性片段^[3], 尽管由于时间进程的原因我们的研究工作还没有完成将这种多态性片段与其表现性状连锁, 但通过两年多地面保持培养后仍保持高固氮酶活性的事实, 说明固氮酶活性的提高是稳定的遗传水平的变化. 这种变异的诱因是空间环境条件. 本研究在回转器实验中发现 AoSR16 和 AoSR16—17 的光合与呼吸效率明显高于出发株, 而光合作用和呼吸作用产生的 ATP 和 NADPH 同高固氮酶活性对能量和还原剂的需求是相适应的.

AoSR16 和 AoSR16—17 在回转器培养时, 生长增强, 氨排出和藻胆蛋白累积明显低于地面培养, 这更说明了它们对空间微重力环境的适应.

参 考 文 献

- [1] 刘永定等. 返地卫星搭载对鱼腥藻和小球藻的影响. 科学通报, 1993, 38(2):177—180
- [2] 胡章立, 刘永定. 微藻在空间飞行环境中的生存与适应. 空间科学学报, 1997, 17(增刊):95—101
- [3] 胡章立, 宋立荣, 刘永定. 空间飞行对稻田鱼腥藻遗传特性的影响. 航天医学与医学工程, 1998, (待出版)
- [4] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 1949, 24(1):1—15
- [5] Liu Y D *et al.* Studies on the biology of algae: I. Preliminary observation on the adaptation of microalgae to the space environment. *ELGRA News*, 1991, 13:8
- [6] Siegelman H W, Kycia J H. Algal biliproteins. In:Hellebust J A, Graigie J S ed. Handbook of Phycological Methods, Physiological and Biochemical Methods. Cambridge:Cambridge Univ. Press, 1978. 71—79
- [7] Solotzano L. Determination of ammonia in natural waters by the phenolphthorite method. *Limnol and Oceanography*, 1969, 14(5/6):779—801

**THE COMPARATIVE STUDIES ON THE
METABOLIC CHARACTERISTICS BETWEEN
Anabaena oryza HB23 AND ITS MONOCLONAL
STRAINS RETRIEVED FROM SPACE
FLIGHT AND REFLIGHT**

HU Zhangli LIU Yongding

(Institute of Hydrobiology,
The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract

The metabolic features of *Anabaena oryza* HB23 and AoSR16, AoSR16—17 were analyzed. Obvious differences in the growth rate, activities of nitrogenase, photosynthesis and respiration, as well as phycobiliprotein content and ammonium excretion between the original and space flight, reflight retrieved strains were found. The changes of nitrogen metabolism as an adaptation of phenotype, and the mutants including AoSR16 and AoSR16—17 as another adaptation of phenotype to space flight and reflight were confirmed. Results indicated that biological responses of algae to space environment included two types of changes, the recoverable phenotype response and the heritable genotype response.

Key words *Anabana oryza*, Metabolism, Phenotype segregation, Space environment