

刘树文, 罗丽丽. pH 值对葛仙米生理的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 153–155.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.041

# pH 值对葛仙米生理的影响

刘树文, 罗丽丽

(贵州师范学院化学与生命科学学院, 贵州贵阳 550018)

**摘要:**研究不同培养液 pH 值(6.0、7.0、8.0)对葛仙米(*Nostoc sphaeroides* Kützinger)生理的影响。结果表明,当培养液中 pH 值为 7.0 时,葛仙米的比生长速率最大,各种主要光合色素、可溶性糖及可溶性蛋白质含量最高;当培养液的 pH 值为 8.0 时葛仙米的上述各项生理指标小于 pH 值 6.0 条件下的葛仙米的上述各项生理指标。因此,当培养液中 pH 值为 7.0 是培养贵州野生葛仙米较为适合的 pH 值。

**关键词:**葛仙米;pH 值;生理指标;比生长速率;光合色素;可溶性糖;可溶性蛋白质

**中图分类号:** S968.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)05-0153-03

葛仙米(*Nostoc sphaeroides* Kützinger)学名拟球状念珠藻,生长于水稻田中,是我国传统出口的一种珍贵野生药食两用固氮蓝藻,营养价值丰富,食用历史悠久<sup>[1]</sup>。其蛋白含量较高,含有丰富的人体必需的各种氨基酸、脂肪酸、维生素以及矿物质,并且含有具有药用价值的各种多糖、色素等,还含有超氧化物歧化酶等生理活性物质<sup>[1-2]</sup>。因此,它在保健食品、食品添加剂、动物饲料、医药、美容以及精细化加工等领域具有广阔的开发应用前景<sup>[1-2]</sup>。葛仙米在世界范围内分布稀少,主要分布在我国湖北省鹤峰县走马镇<sup>[1]</sup>,目前国内外对葛仙米的研究相对较少,对其开发利用也没有像小球藻、螺旋藻和盐藻那样已实现产业化<sup>[2]</sup>。为了合理地开发利用葛仙米这种珍稀食品,对葛仙米的人工培养条件及生理特性的研究意义重大。

一些研究表明,水体的 pH 值影响藻类生长和生理代谢以及藻类种群的演替,不同的藻类有不同的 pH 值适应范围<sup>[3-8]</sup>。pH 值会影响藻类对无机碳及铁等微量元素在水体中的存在形式,进而影响藻类对无机碳和铁等微量元素的吸收利用<sup>[8]</sup>,藻类在生长过程中也会改变水体 pH 值<sup>[9]</sup>。水体 pH 值增加通常会引起蓝藻占优势<sup>[10]</sup>。薛凌展等研究表明,铜绿微囊藻适合生长的 pH 值为 8~11,最佳 pH 值为 9;而普通小球藻适合生长的 pH 值为 7~9,最佳 pH 值为 8<sup>[11]</sup>。共同培养的试验结果显示碱性环境中铜绿微囊藻的竞争优势强于

普通小球藻<sup>[11]</sup>。

本研究比较了不同 pH 值(6.0、7.0、8.0)对葛仙米生长以及各种光合色素、可溶性糖、可溶性蛋白含量等方面的生理影响差异,并在培养液中加入 pH 值缓冲剂固定葛仙米生长过程中的 pH 值,旨在发现人工培养野生葛仙米的最适合 pH 值,为野生葛仙米的规模化养殖提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2015 年 4 月从贵州省岑巩县开本乡沈家湾村采集得到新鲜野生葛仙米球形体。先将葛仙米球形体用无菌的蒸馏水冲洗干净,再用 75% 乙醇溶液浸泡 30 s,去杂藻杂菌,然后用无菌 BG<sub>110</sub> 培养液(不含 NaNO<sub>3</sub> 的 BG<sub>11</sub> 培养基)清洗 3 次。再放入葛仙米群体质量 1 倍的 BG<sub>110</sub> 培养液,用玻璃匀浆器匀浆成丝状藻浆,然后用无菌 BG<sub>110</sub> 培养液稀释。培养温度为 25 ℃,用 30 W 日光灯提供光照,光照度为 1 500 lux。用空气泵通入用 0.22 μm 滤膜过滤的无菌空气,通气量为 300 mL/min。经过 15 d 的培养,得到无杂菌和杂藻的野生葛仙米藻种。

### 1.2 培养条件

葛仙米的培养采用 BG<sub>110</sub> 培养基,配制 BG<sub>110</sub> 时加入 BICINE(*N,N*-二羟乙基甘氨酸)生物缓冲剂,缓冲剂浓度为 20 mmol/L<sup>[8]</sup>,用 0.1、1.0 mol/L HCl 或 NaOH 溶液调节 BG<sub>110</sub> 培养基 pH 值为 6.0、7.0、8.0,在 121 ℃下灭菌 30 min。藻种经过匀浆之后分别接种到高压灭菌后的 9 个 500 mL 锥形瓶,分别加入 pH 值为 6.0、7.0、8.0 的 BG<sub>110</sub> 培养基,藻液总体积为 450 mL/瓶,初始接种量按照叶绿素含量 450 μg/mL。每组 pH

的影响研究[D]. 南昌:江西农业大学,2013.

[3] 陈岩峰,梁阿政,孙世坤,等. 肉鸭网床平养与地面平养对比试验研究[J]. 中国家禽,2013,35(1):33–36.

[4] 韩晓萍,刘林秀,储怡士,等. 3 种不同饲养方式对山麻鸭生产性能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014(22):28–29.

[5] 王荣民,丁君辉,刘继明,等. 不同饲养方式对肉鸭生产性能的影响[J]. 江西畜牧兽医杂志,2013(1):16–18.

收稿日期:2016-10-27

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660115);贵州省科技项目[编号:黔科合 J 字(2013)2243 号];贵州师范学院博士项目(编号:12BS030)。

作者简介:刘树文(1980—),男,湖北黄冈人,博士,副教授,研究方向为藻类生理生化。E-mail:1059834578@qq.com。

对肉鸭生长性能、屠宰率及羽毛生长发育的影响还有待于进一步从血液、生理生化等指标进行深入研究,为肉鸭健康养殖提供依据。

## 参考文献:

[1] 杨宁. 家禽生产学[M]. 北京:中国农业出版社,2002.

[2] 顾瑶. 樱桃谷商品肉鸭不同饲养模式对生产性能等相关指标

值条件设置 3 个重复。培养温度为 25 ℃,用 30 W 日光灯提供光照,光照度为 1 500 lx。用空气泵通入用 0.22 μm 滤膜过滤的无菌空气,通气量为 300 mL/min,经过 10 d 光照培养。

1.3 生长曲线的制作和比生长速率的测定

在葛仙米的生长过程中,每隔 1 d 取 1 次藻液。培养液 pH 值为 6.0、7.0、8.0 的培养瓶中各取 20 mL 藻液,4 000 r/min 离心 30 min,倒掉上清液,加入 4 mL 95% 乙醇,振荡,4 ℃ 冰箱中避光放置 24 h。4 000 r/min 离心 30 min,取上清液,用分光光度计分别测定 665、649 nm 波长的吸光度  $D_{665\text{ nm}}$ 、 $D_{649\text{ nm}}$ 。根据以下公式计算叶绿素 a (Chlorophyll a, Chla) 含量 (μg/mL)<sup>[12]</sup>:  $Chla = 13.95 \times D_{665\text{ nm}} - 6.88 \times D_{649\text{ nm}}$ 。绘制时间 (d)、叶绿素含量 (μg/mL) 的生长曲线图。比生长速率  $\mu$  的计算依据公式  $\mu = (\ln x_1 - \ln x_2) / (T_2 - T_1)$ ,其中  $x_1$  和  $x_2$  分别为培养后 0、10 d 的叶绿素 a 含量 (μg/mL), $T_1$ 、 $T_2$  分别为培养后 0、10 d。

1.4 各种主要光合色素含量的测定

从培养 10 d 的葛仙米藻液中按照“1.2”节的方法取样和提取色素,用分光光度计分别测定 665、649、447 nm 波长的吸光度  $D_{665\text{ nm}}$ 、 $D_{649\text{ nm}}$ 、 $D_{470\text{ nm}}$ 。计算叶绿素 a 与类胡萝卜素 (carotenoids, Car) 含量,其中 Car 含量的计算依据公式<sup>[12]</sup>:  $Car = 1\,000 \times D_{470\text{ nm}} - 2.05 \times Chl\ a$ 。

从培养 10 d 的葛仙米藻液中各取 20 mL 的藻液,4 000 r/min 离心 30 min,去上清液,各加入 4 mL pH 值为 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液,冰浴匀浆 90 次,4 000 r/min 离心 30 min。取上清液,用分光光度计分别测定上清液在 562、615、652 nm 波长的吸光度  $D_{562\text{ nm}}$ 、 $D_{615\text{ nm}}$ 、 $D_{652\text{ nm}}$ 。计算藻蓝蛋白 (pycocyannin, PC)、别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC)、藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 的含量。根据 Siegelman 等的公式<sup>[13]</sup>计算:  $PC\ (\text{mg/mL}) = (D_{615\text{ nm}} - 0.474 \times D_{652\text{ nm}}) / 5.34$ ;  $APC\ (\text{mg/mL}) = (D_{652\text{ nm}} - 0.208 \times D_{615\text{ nm}}) / 5.09$ ;  $PE\ (\text{mg/mL}) = (D_{562\text{ nm}} - 2.41 \times PC - 0.849 \times APC) / 9.62$ 。

1.5 蛋白质含量的测定

从培养 10 d 的葛仙米藻液中各取 20 mL 的藻液,4 000 r/min 离心 30 min,去上清液,各加入 4 mL pH 值为 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液,冰浴匀浆 90 次,4 000 r/min 离心 30 min。取上清液,用考马斯亮蓝法测定各样品中蛋白质的浓度<sup>[12]</sup>。

1.6 可溶性糖含量的测定

培养 10 d 的各瓶葛仙米藻液各取 20 mL 的藻液,4 000 r/min 离心 30 min,去上清液,各加入 4 mL 蒸馏水,冰浴匀浆 90 次,4 000 r/min 离心 30 min。取上清液,蒽酮试剂法测定各样品中可溶性糖浓度<sup>[13]</sup>。

1.7 统计分析

本试验主要利用软件 STATISTICA® 7.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) 进行统计分析处理。单因素方差分析 (ANOVA) 和 Tukey's 显著性检验 (HSD) 用来检测不同处理间的显著性水平。Lilliefors 检验和 Levene 检验分别用来检验正态分布和方差同质性分析。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 值条件下葛仙米的生长

研究显示,葛仙米分别在 6.0、7.0、8.0 pH 值条件下培养

10 d 后,以叶绿素浓度表示的生物量分别增加到培养后 0 d 的 6.61、9.21、7.47 倍 (图 1)。当 pH 值为 7.0 时,葛仙米的比生长速率显著高于其他 2 种不同 pH 值条件下葛仙米的比生长速率 (Tukey's HSD,  $P < 0.05$ ), pH 值为 8.0 时葛仙米的生长速率略高于 pH 值为 6.0 培养条件下葛仙米的比生长速率,但 2 者之间无显著差异 (Tukey's HSD,  $P > 0.05$ ) (表 1)。

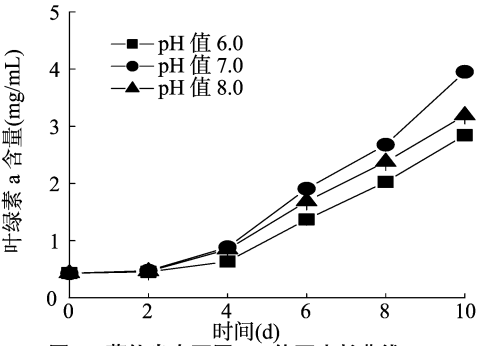


图1 葛仙米在不同 pH 值下生长曲线

表 1 在不同 pH 值葛仙米的比生长速率

pH 值	比生长速率
6.0	0.212 ± 0.005b
7.0	0.243 ± 0.002a
8.0	0.224 ± 0.002b

注:不同的小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ),相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。表 2、表 3 同。

2.2 不同 pH 值条件下葛仙米的光合色素含量的变化

研究显示,pH 值对葛仙米 PC、APC、PE 含量以及 Chla 含量、Car 含量有不同影响 (表 2、表 3)。当 pH 值为 7.0 时,葛仙米的各种光合色素的含量最高,pH 值为 8.0 时的葛仙米各种光合色素的含量高于 pH 值为 6.0 时,且都有显著差异 (Tukey's HSD,  $P < 0.05$ )。当 pH 值为 7.0 时,葛仙米的 PC、APC、PE、Chla、Car 的含量分别为 pH 值为 8.0 和 6.0 时葛仙米的光合色素含量的 1.37、1.57、1.41、1.12、1.18 倍和 2.14、3.12、2.30、1.32、1.34 倍。

表 2 不同 pH 值条件下葛仙米的 PC、APC、PE 的含量

pH 值	PC 含量 (μg/mL)	APC 含量 (μg/mL)	PE 含量 (μg/mL)
6.0	24.75 ± 3.403c	9.42 ± 0.790c	10.85 ± 1.237c
7.0	52.88 ± 4.957a	29.43 ± 1.488a	24.97 ± 2.143a
8.0	38.73 ± 2.055b	18.78 ± 1.399b	17.68 ± 0.932b

表 3 不同 pH 值条件下葛仙米的 Chla 和 Car 含量

pH 值	Chla 含量 (μg/mL)	Car 含量 (μg/mL)
6.0	3 379.23 ± 91.3749c	0.69 ± 0.007c
7.0	4 460.44 ± 64.073a	0.93 ± 0.031a
8.0	3 961.43 ± 42.248b	0.79 ± 0.008b

2.3 不同条件下葛仙米的可溶性蛋白含量的变化

研究发现,pH 值对葛仙米的可溶性蛋白含量有影响。当 pH 值为 7.0 时,葛仙米的可溶性蛋白质含量显著高于 pH 值为 8.0、6.0 时葛仙米的可溶性蛋白含量,分别是 pH 值为 8.0、6.0 时的 1.3、2.0 倍。当 pH 值为 7.0 时,葛仙米的可溶性蛋白含量最高,pH 值为 8.0 时葛仙米的可溶性蛋白含量高于 pH 值 6.0 时,且都有显著差异 (Tukey's HSD,  $P < 0.05$ , 图 2)。

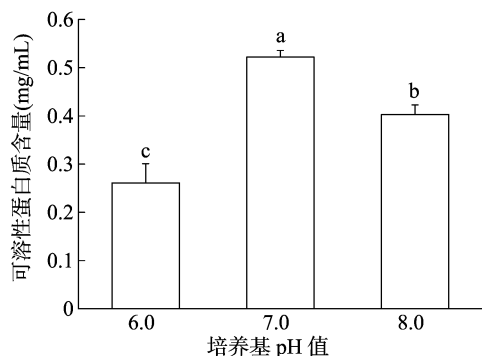


图2 葛仙米在不同 pH 值下的可溶性蛋白质含量

#### 2.4 不同 pH 值条件下可溶性糖含量的变化

研究发现,pH 值对葛仙米可溶性糖含量有影响(图3)。当 pH 值为 7.0 时,葛仙米的可溶性糖含量显著高于 pH 值为 8.0、6.0 时葛仙米的可溶性糖含量。pH 值为 8.0 时葛仙米的可溶性糖含量略高于 pH 值为 6.0 时葛仙米的可溶性糖含量,但两者之间无显著差异(Tukey's HSD,  $P > 0.05$ )。

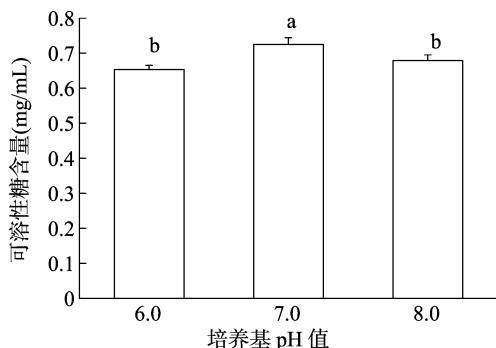


图3 葛仙米在不同 pH 值下的可溶性糖含量

### 3 结论与讨论

本研究结果表明,当培养液中 pH 值为 7.0 时,培养 10 d 后以叶绿素含量表示的葛仙米生物量增长幅度和比生长速率最大,各种光合色素、可溶性糖及可溶性蛋白质含量最高,当培养液中的 pH 值为 8.0 时上述各项生理指标高于培养液 pH 值为 6.0 时的上述各项生理指标。因此,pH 值为 7.0 的培养液比较适合贵州野生葛仙米的人工养殖。

刘继勇对湖北省走马镇的葛仙米资源及葛仙米生长的环境条件进行调查,结果表明,适于葛仙米生长的灌溉水源 pH 值为 6.2~6.3<sup>[14]</sup>。但该研究并未调查葛仙米生长水体的 pH 值,葛仙米生长水体的 pH 值会受到农业生产的影响,如农业生产施肥以化肥为主的碳铵等肥料的使用会改变土壤及农田水体的酸碱度<sup>[1]</sup>。程超等在葛仙米生长及繁殖条件的探讨的研究中以葛仙米的生长曲线总结得出,葛仙米最适生长 pH 值为 6.0~7.5, pH 值过高或过低都会影响它的生长及颜色<sup>[15]</sup>。在一定范围内,随着 pH 值的升高,葛仙米的颜色会加深,直至 pH 值升至 7.5,但该研究没有考虑葛仙米生长过程中 pH 值的变化<sup>[15]</sup>。藻类的种群密度和生理代谢活动都会影响水体的 pH 值,藻类生长过程中水体的 pH 值是不断发生变化的<sup>[9]</sup>。本研究通过 pH 值缓冲剂固定培养液的 pH 值,得到固定 pH 值条件下葛仙米的各项生理指标。

溶解在水体中的  $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{CO}_2$  都是藻类可以直接或间接吸收利用的无机碳形式。pH 值会影响到培养液中  $\text{CO}_2$  溶解度以及  $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{CO}_2$  三者之间的解离平衡,进而影响藻类对无机碳的吸收利用效率及光合作用速率<sup>[9]</sup>。 $\text{CO}_2$  是藻类易于吸收的形式,pH 值升高使水体中溶解的  $\text{CO}_2$  含量降低而  $\text{HCO}_3^-$  含量升高。但 pH 值降低,水体中总无机碳含量降低<sup>[16]</sup>。铁等微量金属元素在藻类光合和呼吸等代谢过程中起重要作用,pH 值还影响水体中  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  之间的相互转化,从而影响藻类对铁的吸收利用<sup>[16]</sup>。因此,pH 值为 6.0 时葛仙米的各项生理指标较 pH 值为 7.0 时低,可能是因为培养液中总无机碳浓度较低,影响了葛仙米的光合固碳。pH 值为 8.0 时葛仙米的各项生理指标也较 pH 值为 7.0 时低,可能是因为 pH 值升高导致水体中可利用铁含量降低。

#### 参考文献:

- [1] 陈德文,汪兴平,潘思铁. 葛仙米的研究现状及应用前景[J]. 食品科学,2003,24(11):153-156.
- [2] 田志环,焦传珍. 葛仙米研究现状及其开发前景[J]. 食品研究与开发,2007,28(2):170-172.
- [3] 刘春光,金相灿,孙凌,等. pH 值对淡水藻类生长和种类变化的影响[J]. 农业环境科学学报,2005,24(2):294-298.
- [4] 陈家长,王菁,裴丽萍,等. pH 值对鱼腥藻和普通小球藻生长竞争的影响[J]. 生态环境学报,2014,23(2):289-294.
- [5] 王志红,崔福义,安安全,等. pH 值在藻类“水华”现象中的影响探讨[J]. 环境污染与防治,2004(2):158.
- [6] 陈家长,王菁,裴丽萍,等. pH 值对鱼腥藻和普通小球藻生长竞争的影响[J]. 生态环境学报,2014,23(2):289-294.
- [7] 刘春光,金相灿,孙凌,等. 水体 pH 值和曝气方式对藻类生长的影响[J]. 环境污染与防治,2006,28(3):161-163.
- [8] 马祖友,储昭升,胡小贞,等. 不同磷质量浓度体系中 pH 值变化对铜绿微囊藻和四尾栅藻竞争的影响[J]. 环境科学研究,2005,18(5):30-33.
- [9] 许海,刘兆普,袁兰,等. pH 值对几种淡水藻类生长的影响[J]. 环境科学与技术,2009,32(1):27-30.
- [10] Hörnström E. Phytoplankton in 63 limed lakes in comparison with the distribution in 500 untreated lakes with varying pH value[J]. Hydrobiologia,2002,470(1-3):115-126.
- [11] 薛凌展,黄种特,林泽,等. 铜绿微囊藻和普通小球藻在不同 pH 值下生长特性及竞争参数计算[J]. 福建农业学报,2010,25(2):142-148.
- [12] 张志良,翟伟菁,李小方. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2009:118-119.
- [13] Siegelman H W, Kycia J H. Algal biliproteins[M]//Hellebust J A, Craigie J S. Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1978:71-79.
- [14] 刘继勇. 食用蓝藻葛仙米的二氧化碳浓缩机制及其生理生态学探讨[D]. 武汉:华中师范大学,2004.
- [15] 程超,莫开菊,汪兴平. 葛仙米生长及繁殖条件的探讨[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2003,21(4):14-17.
- [16] 王小琴. 铁限制及 *petE* 基因失活对蓝藻光合生理的影响[D]. 武汉:华中师范大学,2014.