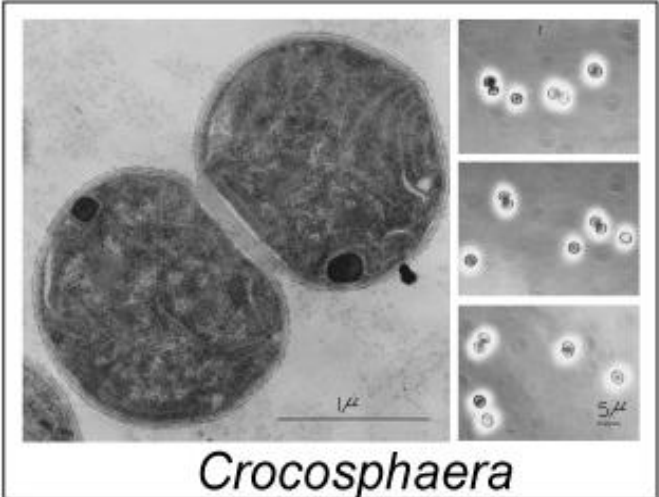


铝影响海洋固氮蓝藻 (*Crocospaera watsonii*) 固氮速率的探究

The Effect of Aluminum on the Nitrogen Fixation of *Crocospaera watsonii*



卢一平 吴起澜 毕晓瞳

摘要: 大气沉降向海洋表层输入大量的铝, 然而少有研究报道铝对海洋浮游植物尤其固氮生物的影响。我们以 Aquil 培养基 (无氮硅营养盐) 半连续培养一种海洋单细胞固氮蓝藻 (*Crocospaera watsonii*), 利用流式细胞技术、¹⁵N 同位素示踪法和荧光 PCR 定量分析, 研究不同磷浓度水平下铝 (0、0.2、2 和 20 μ M) 对其生长速率和固氮速率的影响。实验结果表明: 在磷酸盐充足的条件下, 铝处理组中该固氮蓝藻的生长速率和固氮速率明显受到抑制; 而在磷酸盐缺乏条件下, 铝处理组中该固氮蓝藻的生长速率和固氮速率都明显增加。研究同时表明, 在磷充足和缺乏条件下, 磷结合基因 *pstS* 表达分别上调和下调, 表明铝可能通过影响该固氮蓝藻对磷的吸收进而影响其生长和固氮。

关键词: 铝; 单细胞固氮蓝藻; *Crocospaera watsonii*; 固氮作用

Abstract:

Large amount of aluminum is input into the ocean through atmospheric dust deposition every year, however, few studies have reported that the effect of aluminum on marine phytoplankton, especially on the nitrogen-fixing cyanobacteria. In this study, a unicellular marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Crocospaera watsonii* was grown in Aquil medium without silicate and nitrogen by semi-continuous cultures. Using flow cytometry and ^{15}N isotope tracer method, we studied the effect of aluminum (0, 0.2, 2 and 20 μM) on the growth and nitrogen fixation of *Crocospaera watsonii*. Data showed that aluminum inhibited the growth and nitrogen fixation of *Crocospaera watsonii* in phosphorus replete medium; While aluminum stimulated the growth and nitrogen fixation of *Crocospaera watsonii* in low phosphorus medium. Data also showed that the expression of the high-affinity phosphate binding protein *pstS* treated with aluminum significantly were lower and higher in P-replete and P-deficient condition, respectively. Our results demonstrate that aluminium may affect the growth and nitrogen fixation of *Crocospaera watsonii* through affecting its phosphorus uptake and metabolism of cellular phosphate compounds.

Keywords:

aluminum; nitrogen-fixing cyanobacteria; *Crocospaera watsonii*; nitrogen fixation

目录

摘要.....	2
一、研究背景	
(一) 选题由来	5
(二) 实验设计	6
(三) 技术路线	9
(四) 实验目的与名称	10
二、研究过程	
实验一：铝对固氮蓝藻生长速率的影响.....	10
实验二：铝对固氮蓝藻固氮速率的影响.....	12
实验三：铝对固氮蓝藻细胞内碳、氮和磷含量的影响.....	16
实验四：铝对固氮蓝藻 <i>pstS</i> 基因的表达的影响.....	21
三、实验结论	25
四、项目特色	26
(一) 科学性	26
(二) 创新性	26
(三) 实用性	28
附 参考文献	

一、研究背景

(一) 选题由来

氮是生物生长所必须的元素, 其参与构成蛋白质和核酸等重要生命物质。在海洋中, 尽管海水中溶解的氮气较多, 但它无法被大部分生物直接利用, 大多数海洋生物能够利用 NO_3^- 和 NH_4^+ 等无机含氮化合物, 且海洋表层中 NO_3^- 和 NH_4^+ 含量都很低, 通常不超过 $0.5\mu\text{M}$, 因而氮成为初级生产力的限制因子之一 (沈国英 等, 2010)。

固氮生物能通过利用固氮酶把氮气转化为生物可利用的氮, 这个过程称为生物固氮, 其固定的氮称之为“新氮”。这些新氮可在硝化作用下被氧化为 NO_3^- , 最后在脱氮作用下转变为 N_2 , 生物固氮为初级生产者提供新氮以支持初级生产, 进而在海洋碳氮循环中具有不可替代的作用 (沈国英 等, 2010)。

在寡营养海域, 固氮生物生长可能受磷和铁的限制。大量的研究表明, 大气沙尘沉降带来的磷和铁促进了束毛藻和其他固氮生物类群的生长 (林峰, 2013)。大气沉降不但带来了铁, 同时也带来了大量的铝, 铝是地壳中含量最为丰富的金属元素, 大量的铝可随大气沙尘沉降输入到海洋 (任景玲, 2010)。那么, 铝是否也会像铁一样对固氮生物产生一定的影响呢? 我们了解到学长们曾经做过“铝对威氏海链藻生长影响的研究”, 因而对铝产生了较浓厚的兴趣。我们请教专家, 他们认为: 尽管目前认为溶解态的铝是一种非营养元素, 但铝有可能通过影响生物对营养盐的吸收进而影响固氮生物的生长。已有的文献表明, 铝可以对不同的海洋生物造成不同的影响, 然而较少人关注铝对于海洋固氮生物的影响 (史荣君 等, 2015)。

通过查询文献, 我们了解到: 在海洋中, 固氮生物一般分为丝状蓝藻、单细胞蓝藻、共生蓝藻和固氮细菌等, 这些固氮生物主要分布在温度较高的热带亚热带的寡营养盐海区 (张润, 2010)。一直以来, 丝状固氮蓝藻束毛藻被认为是海洋中分布最广且最重要的固氮生物。近年来, 随着分子生物学的发展, 逐渐发现单细胞固氮蓝藻的丰度和固氮速率也相对较高且不容忽视, 其在局部海域的丰度和固氮量与束毛藻相当甚至超过束毛藻, 目前发现单细胞固氮蓝藻共分为 A、B 和 C 三个类群 (张润, 2010)。鉴于单细胞固氮蓝藻对固氮的重要贡献, 因此本次试验采用 *Crocospaera watsonii* (本论文中, 我们将其简称为“固氮蓝藻”) 作为研究单细胞固氮生物材料, *Crocospaera watsonii* 属于 B 类群, 其生长速率较快, 并且可在实验室培养, 是研究海洋固氮生物的重要模式种之一, 已进行全基因组测序, 相关基因研究也较多, 目前该藻是国际研究的热点。

于是，我们决定运用流式细胞技术检测细胞生长速率，利用 ^{15}N 同位素示踪法检测固氮速率，同时利用分子生物学方法（荧光定量 PCR）来从分子层面解释发现的现象，进而研究铝对该海洋重要的固氮模式生物（*Crocospaera watsonii*）的生长速率和固氮速率的影响，为揭示铝对自然海水中固氮生物生长和固氮的影响提供研究基础。

（二）实验设计

经中国科学院南海研究所的专家介绍，本实验采用的藻种 *Crocospaera watsonii*（WH0003）由美国南加州大学提供，该株系自 2000 年在北太平洋的 ALOHA 站位分离出来后，已经成功在实验室培养多年，其生长速率较快且基因组已经被测序，是研究海洋固氮生物的重要模式种之一。该藻种细胞呈球形，直径约 $5\mu\text{m}$ ，生长过程中产生大量细胞外多糖，浓度较大时藻液呈淡黄色粘液状（图 1）。

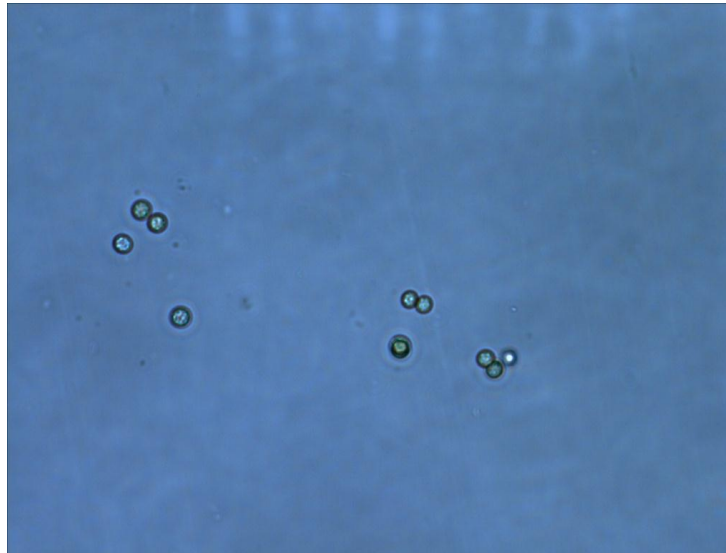


图 1 *Crocospaera watsonii*（WH0003）的形态特征

试验中，由于南加州大学的实验室已经对该株系藻种的培养条件进行了优化，因此我们采用原来相同的培养条件进行培养。

具体培养条件为：光周期和暗周期分别为 12h/12h，温度为 28°C ，光照强度为 $120\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ，培养基采用无氮和硅酸盐的 Aquil 培养基培养（具体配方如下）。

为了避免实验培养瓶可能与内部的培养基发生物质交换，进而可能干扰实验。本试验中培养容器全部为稀盐酸（ $2.5 \times 10^{-3}\text{M}$ ）浸泡一周后用超纯水洗干净的 0.5L 的聚碳酸酯瓶（Nalgene）。

实验中，我们设置 0、0.2、2 和 $20\mu\text{M}$ 四个铝浓度梯度，其中 $0.2\mu\text{M}$ 代表自然海水中的最

大铝溶解浓度, 2 μ M 代表河口区域最大铝浓度, 20 μ M 代表海水中最大铝溶解浓度, 每个梯度设三个平行样, 以减小实验误差。我们通过加入 AlCl₃ 母液的方式来调节铝浓度, 并且放置一个晚上, 使铝形态保持稳定后再进行接种。

我们采取了半连续培养的方法, 每三天转接一次, 从 3 个平行样中选择长势良好的一组接种到下一代的三个平行样中, 同时每天于固定时间摇晃培养瓶, 以使该固氮蓝藻保持较高的生长速率。通过流式细胞仪计数并结合计算, 保持下一代初始藻浓度约为 20 $\times 10^3$ 个/ml。

专家告诉我们, 藻类每到一个新的环境, 都需要一段时间来适应。本实验中, 在该固氮蓝藻适应所添加浓度梯度的铝之前, 实验的现象不稳定, 而这段适应时间至少需要我们培养 8 代, 于是, 我们决定从第 9 代开始对该固氮蓝藻的生长和固氮等进行检测。

Aquil 培养基具体配置如下:

1) 人工海水

按下表中试剂用量, 依次称量并溶解配置实验工作人工海水, 人工海水预先用 0.45 μ m 的聚碳酸酯滤膜过滤, 为防止其他金属离子污染, 故用微波灭菌。

成分	加量 g/L	培养基最终浓度
NaCl	24.54	4.2 $\times 10^{-1}$ M
Na ₂ SO ₄	4.09	2.88 $\times 10^{-2}$ M
KCl	0.7	9.39 $\times 10^{-3}$ M
NaHCO ₃	0.2	2.38 $\times 10^{-3}$ M
KBr	0.1	8.4 $\times 10^{-4}$ M
H ₃ BO ₃	0.003	4.85 $\times 10^{-5}$ M
NaF	0.003	7.15 $\times 10^{-5}$ M
MgCl ₂ .6H ₂ O	11.1	5.46 $\times 10^{-2}$ M
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.54	1.05 $\times 10^{-2}$ M
SrCl ₂ .6H ₂ O	0.017	6.38 $\times 10^{-5}$ M

2) 磷酸盐:

用 NaH₂PO₄ H₂O 先配置储备液, 添加 1ml 储备液至 1L 人工海水, 即可配置成试验中培养基。

成分	储备液加量 g/L	工作液加量 L ⁻¹	培养基最终浓度
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1.38	1mL	1×10 ⁻⁵ M

3) 金属元素:

首先, 按照下表配置金属元素储备液, 加 29.2 g 的 EDTA.2H₂O 至 950ml 超纯水中, 溶解后, 再依次加入其它金属元素, 最后定容至 1L 作为金属储备液。

成分	储备液加量 g/L	工作液加量 L ⁻¹	培养基最终浓度
EDTA.2H ₂ O	29.2	1ml 混合储备液	1×10 ⁻⁴ M
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.27		1×10 ⁻⁶ M
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.023		7.97×10 ⁻⁸ M
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.024		1.21×10 ⁻⁷ M
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.012		5.03×10 ⁻⁸ M
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0242		1×10 ⁻⁷ M

4) 维生素:

首先, 按照下表浓度分别配置维生素 B₁₂ 和生物素一级储备液。然后, 取 100mg 维生素 B₁ 至 950ml 充分溶解, 再分别加入 1ml 维生素 B₁₂ 和生物素一级储备液, 最终配置成试验中工作培养基。

成分	一级储备液	加量 L ⁻¹	培养基最终浓度
维生素 B ₁		100 mg	2.97×10 ⁻⁷ M
生物素	5.0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	2.25×10 ⁻⁹ M
维生素 B ₁₂	5.5 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	3.7×10 ⁻¹⁰ M

(三) 技术路线

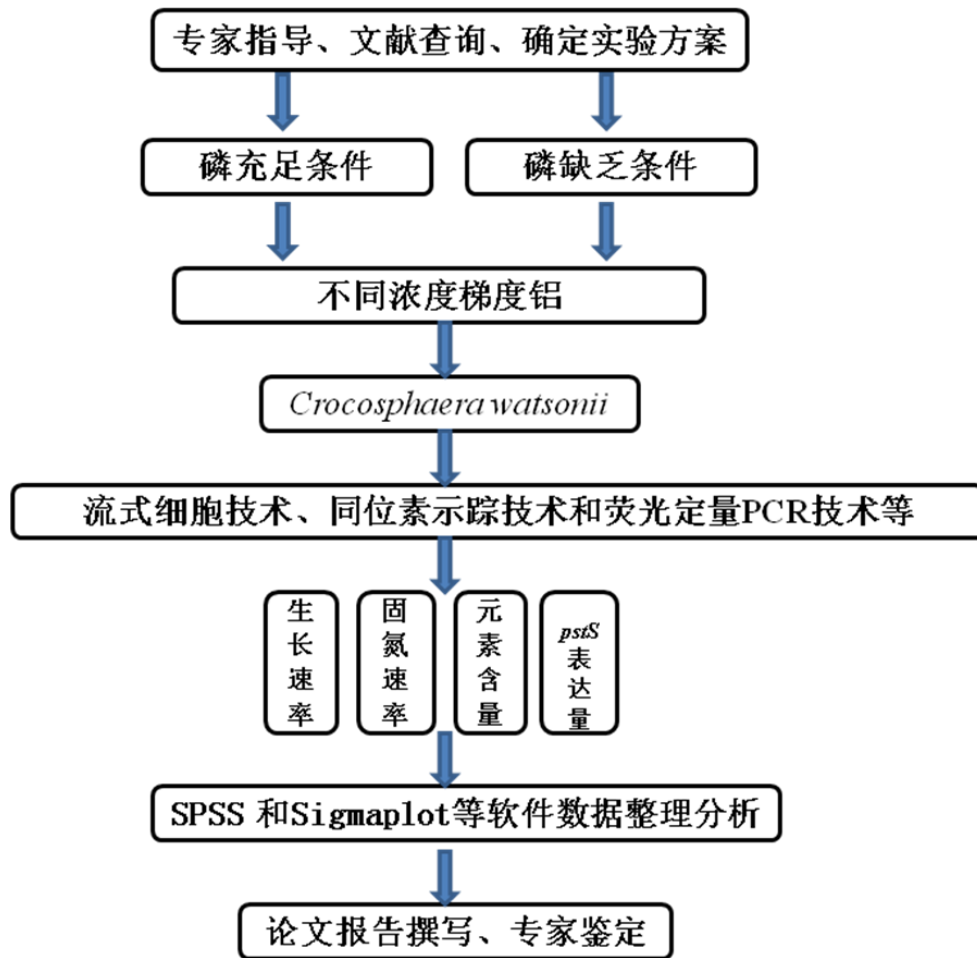


图 2 技术路线图

(四) 实验名称与目的

顺序	实验名称	实验目的
实验一	铝对固氮蓝藻生长速率的影响	探究在不同磷浓度水平下不同浓度的铝对固氮蓝藻生长速率的影响
实验二	铝对固氮蓝藻固氮速率的影响	探究在不同磷浓度水平下不同浓度的铝对对固氮蓝藻固氮速率的影响
实验三	铝对固氮蓝藻细胞内碳、氮和磷含量的影响	探究在不同磷浓度水平下不同浓度的铝对固氮蓝藻细胞内碳氮磷三种大量元素含量的影响
实验四	铝对固氮蓝藻 <i>pstS</i> 基因的表达式的影响	铝在不同磷浓度下对固氮蓝藻产生不同影响的原因

二、研究过程

实验一：铝对固氮蓝藻生长速率的影响

(一) 器材试剂

1) 仪器耗材

流式细胞仪 (Becton Dickinson, Accuri™ C6); 微量移液器 (Eppendorf); 涡旋振荡器; -80度冰箱; 冻存管; 96 孔板, 锡箔纸

2) 试剂

用 0.45 μ m 滤膜过滤后的多聚甲醛溶液

(二) 实验步骤

1) 样品采集

实验中, 每天于光照周期开始后第 9 个小时开始取样, 在超净工作台里用微量移液器取 2ml 藻液装入冻存管, 加入约 40 μ L 过滤的多聚甲醛, 混匀, 在室温下放置 8-10min, 然后用锡箔纸包好贴上标签, 放入-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2) 样品测定并分析

用流式细胞仪进行细胞计数时, 先把样品解冻, 用涡旋振荡器混匀, 然后在通风橱里取 300 μ L 藻液于 96 孔板内, 用 Becton Dickinson, Accuri™ C6 流式细胞仪自动进样。样品以中速进样, 进样体积为 50 μ L, 根据 FL2 (橘色荧光) 对 FL3 (红色荧光) 以及侧向散射光 (SSC) 对 FL3 (红色荧光) 的特征来圈画该固氮蓝藻, 读取软件自动生成的细胞浓度数据 (图 3)。

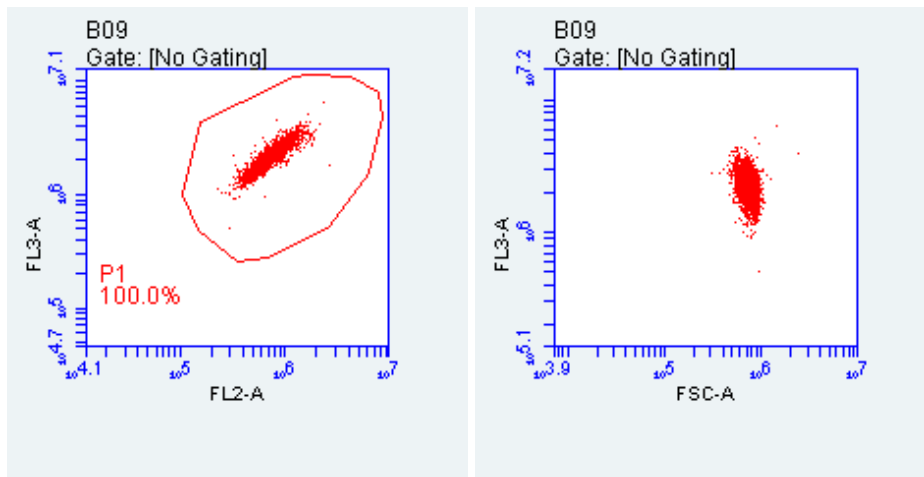


图 3 利用不同荧光对该固氮蓝藻定性和定量分析 (图中圈画的红色部分为该固氮蓝藻)

3) 生长速率的计算

流式细胞仪可以快速并准确的进行细胞计数, 通过生长速率的变化, 探究在不同浓度的铝对单细胞蓝藻生长的影响。通过查阅资料可以得到生长速率 (μ) 计算参考公式为:

$$\mu = (\ln N_1 - \ln N_0) / (T_1 - T_0)$$

式中 N_1 和 N_0 分别为 T_1 和 T_0 时刻的细胞密度 (cells/ml)。在本实验中 T_0 和 T_1 分别为藻液接种后的第 1 天和第 3 天, 而 N_0 和 N_1 可由流式细胞仪测得。

4) 数据分析及作图

本研究中, 所有实验数据以“平均值±标准误”(MEAN±SE)表示 ($n=3$)。用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 其中 $p < 0.05$ 认为组间具有显著性差异。用 Sigmaplot 10.0 进行作图。

(三) 实验结果

通过实验数据分析, 我们发现(图 4):

- 1) 在磷充足的条件下, 相较于对照组, 经过铝处理的单细胞固氮蓝藻生长速率明显降低 ($p < 0.05$), 而且随着铝浓度的上升, 其生长速率降低更为明显。
- 2) 在磷缺乏的条件下, 相较于对照组, 铝处理后反而会加快单细胞固氮蓝藻的生长 ($p < 0.05$)。

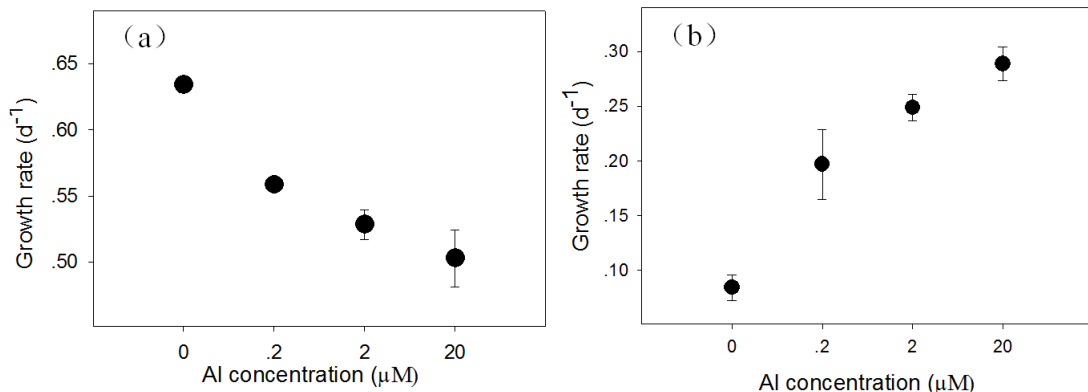


图 4 磷充足 (a) 和磷缺乏 (b) 条件下铝对 *Crocosphaera watsonii* 生长速率的影响

(四) 讨论

本研究中, 在磷充足情况下, 铝对该固氮蓝藻生长起抑制作用; 而在磷缺乏情况下, 铝对其却产生促进作用, 表明铝对该固氮蓝藻的生长依赖于培养基中磷的浓度水平。

铝在不同磷浓度水平下对该固氮蓝藻的生长产生截然相反的影响, 这个结果出乎我们意料。实验中, 生长速率对外界环境较为敏感, 我们的结果可能表明在不同磷状况下铝对该固氮蓝藻的生理方面都产生了显著的影响。固氮作用作为固氮生物获取基本元素氮的重要途径, 在固氮生物的生长发育中有着无法替代的作用。那么, 铝在不同磷浓度水平下对该固氮蓝藻的固氮速率是否也有类似的影响呢? 因此我们打算在之后的研究中探究在磷充足和磷缺乏两种环

境中铝对该固氮蓝藻固氮速率的影响。

实验二：铝对固氮蓝藻固氮速率的影响

（一）器材试剂

1) 仪器耗材

EA-IRMS 系统：元素分析仪（EA）一同位素比值质谱仪联机（Thermo）；Sartorius 百万分之一天平；马弗炉；烘箱；40ml 聚碳酸酯透明瓶（Nalgene）；25ml 直径滤器及滤头（Paul）；隔膜真空泵（津腾）；GF/F 玻璃纤维滤膜（Whatman）

2) 试剂

99 atom% $^{15}\text{N}_2$ （Aladdin）；尿素标准样品（Thermo）

（二）实验步骤

1) 培养并收集样品

在查阅文献后（张润，2010），确定实验操作及测定方法如下：取 30ml 处于对数生长期的藻液于 40ml 的聚碳酸酯瓶，加入 10ml 配置好的含有 $^{15}\text{N}_2$ （99 atom% ^{15}N ；Aladdin）的人工海水母液（100ml 海水中含有 1ml $^{15}\text{N}_2$ ），轻轻晃动混匀后放入光照培养箱培养 3 小时，并设三个重复。用 GF/F 玻璃纤维滤膜（Whatman，预先以 450℃灼烧 4 小时）过滤 40ml 培养前后藻液，收集滤膜放入 -20℃ 冰箱保存，以测定培养前后固氮蓝藻 ^{15}N 的丰度。

2) 样品测定

样品测定前，将滤膜置于 60℃ 烘箱中烘烤 24 小时至干燥，用锡箔包裹烘干的滤膜，通过元素分析仪（EA）一同位素比值质谱仪联机测定样品中的碳（C）氮（N）含量及其同位素组成。

3) 固氮速率的计算

计算方法从文献中查阅而得（张润，2010），具体计算方法如下：

N 同位素组成通常用 δ 来表示，定义为：

$$\delta^{15}\text{N} = \left(\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad \text{①}$$

其中， R_{sample} 和 R_{standard} 分别是样品与参考物质中原子数的比值，即 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ，参考标

准为大气 N₂。

在后续的固氮计算中, 还将用到 ¹⁵N 原子的绝对丰度 A (即 ¹⁵N 的原子百分数):

$$A(\text{atom}\%) = \left(\frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{15}\text{N} + {}^{14}\text{N}} \right) \times 100 \quad (2)$$

结合①②, 就能将 δ¹⁵N 值转化为 δ¹⁵N 绝对丰度:

$$A(\text{atom}\%) = \frac{(10^{-3} \delta^{15}\text{N} + 1)({}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N})_{\text{atm}}}{1 + (10^{-3} \delta^{15}\text{N} + 1)({}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N})_{\text{atm}}} \times 100 \quad (3)$$

根据质量平衡, t=0 时, 体系中可固氮生物利用的底物 N₂ 的 ¹⁵N 的绝对丰度 (原子百分数) 可表示为:

$$A_{N_2}(\%) = \left(\frac{A_S \times V_S + A_{\text{atm}} \times C \times V_b}{V_S + C \times V_b} \right) \times 100 \quad (4)$$

其中:

A_S 是所添加的 ¹⁵N₂ 示踪剂的 ¹⁵N 原子百分数 (99 atom%);

A_{atm} 为大气中 N₂ 的 ¹⁵N 原子百分数 (0.00366 atom%);

V_S 是所添加的 ¹⁵N₂ 示踪剂的体积 (cm³);

V_b 是培养水样体积 (cm³);

C 是海水中 N₂ 的溶解度 (cm³/dm³)

在培养过程中, 藻液中颗粒有机氮的平均含量 (\overline{PN}) 取为培养起止时刻 PN 含量的平均值:

$$\overline{PN}(\mu\text{M}) = \frac{PN_f + PN_0}{2} \quad (5)$$

培养期间, 藻液中的 N₂ 被固氮生物转化为颗粒有机物的快慢用比吸收速率 (specific uptake rate, V_{N₂fix}) 表示:

$$V_{N_2\text{fix}}(h^{-1}) = \frac{1}{\Delta t} \left(\frac{A_{PN_f} - A_{PN_0}}{A_{N_2} - A_{PN_0}} \right) \quad (6)$$

将⑤与⑥相乘, 就得到了体积固氮速率 (AF), 或称为绝对吸收速率 (absolute uptake rate):

$$NF(\text{nmolN} / \text{m}^3 / \text{h}) = V_{N_2\text{fix}} \times \left(\frac{PN_f + PN_0}{2} \right) \times 1000000 \quad (7)$$

它反映了在培养期间单位体积藻液中生物固氮作用将 N₂ 转化为颗粒有机氮的快慢程度。

单位体积藻液的细胞个数可以通过流式细胞仪进行计数, 换算后可以得到单位细胞的固氮

速率, 单位为: $\text{fmol N cell}^{-1}\text{h}^{-1}$ 。

4) 数据分析及作图

本研究中, 所有实验数据以“平均值±标准误”(MEAN±SE)表示 ($n=3$)。用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 其中 $p < 0.05$ 认为组间具有显著性差异。用 Sigmaplot 10.0 进行作图。

(三) 实验结果

通过实验数据分析, 我们发现(图 5):

- 1) 在磷充足情况下, 铝处理组中固氮蓝藻固氮速率都显著低于对照组 ($p < 0.05$);
- 2) 在磷缺乏条件下, 铝处理组固氮速率则显著高于对照组。其中, $0.2\mu\text{M}$ 和 $2\mu\text{M}$ 处理组相对于对照组差异性显著 ($p < 0.05$)。

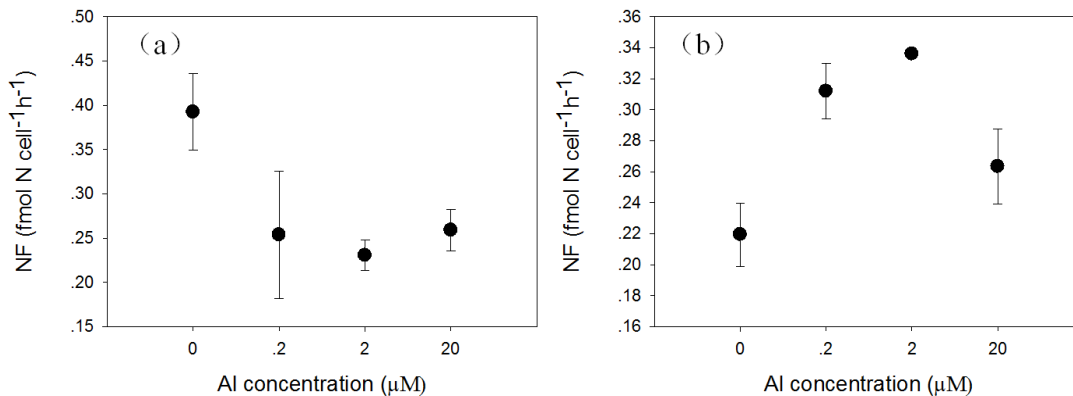


图 5 磷充足 (a) 和磷缺乏 (b) 条件下铝对固氮蓝藻固氮速率的影响

(四) 讨论

本研究中, 在磷充足情况下, 铝对该固氮蓝藻固氮起抑制作用; 而在磷缺乏情况下, 铝对其却产生促进作用, 表明铝对该固氮蓝藻的固氮作用同样依赖于培养基中磷的浓度水平。这种反应与铝对该固氮蓝藻生长速率的影响极为相似!

在咨询专家之后, 我们获悉磷是固氮生物的限制性因子。通过高中生物的学习, 我们知道磷是组成生物体细胞的大量元素, 在核酸和蛋白质的合成、能量产生 (ATP) 以及细胞膜的构成中都起相当重要的作用。那么, 在不同磷浓度水平环境下, 铝对该固氮蓝藻生长速率和固氮速率产生了不同的影响, 这种现象是否与细胞内可利用的磷有关系呢?且已有研究表明, 细胞可利用的磷含量降低可以使固氮蓝藻的固氮速率降低。另一方面, 碳和氮作为细胞所需的最基本元素, 对细胞的生长发育意义非凡。这种情况下, 细胞内有机碳和氮这两种大量元素是否也会发生变化呢?

同时, 铝是如何影响单细胞蓝藻的生长和固氮的呢? 这种影响机制引起了我们的兴趣。在咨询相关专家并查阅文献之后, 于是我们决定观察铝处理后单细胞蓝藻细胞内碳 (C)、氮 (N) 和磷 (P) 三种大量元素的变化情况, 更深入地研究铝对固氮速率产生影响的过程。我们决定使用元素分析仪 (EA) 一同位素比值质谱仪联机测定该固氮蓝藻细胞中的有机碳氮含量, 同时用分光光度计来测量该固氮蓝藻细胞内的有机磷的含量, 以了解铝影响单细胞蓝藻生长和固氮的原因是什么。

实验三: 铝对固氮蓝藻细胞内碳、氮和磷含量的影响

(一) 器材试剂

1) 仪器耗材

EA-IRMS 系统: 元素分析仪 (EA) ——同位素比值质谱仪联机; 722S 分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司)

2) 试剂

硫酸钠 (分析纯); 硫酸镁 (分析纯); 盐酸 (分析纯); 硫酸 (分析纯); 钼酸铵 (分析纯); 酒石酸氧锶钾 (分析纯); 磷酸二氢钾 (优级纯); 抗坏血酸 (分析纯); 三氯甲烷 (分析纯); 尿素标准样品 (Thermo)

(二) 实验步骤

在查阅相关文献后, 确定实验操作及测定方法如下:

1) 细胞内碳和氮元素的测定

用 GF/F 玻璃纤维滤膜 (Whatman, 预先用马弗炉在 450°C 下灼烧 4h) 过滤 40ml 藻液, 收集滤膜放入 -20°C 冰箱保存。样品测定前, 将滤膜置于 60°C 烘箱中烘烤 24 小时至干燥, 用锡箔包裹烘干的滤膜, 通过元素分析仪 (EA) 一同位素比值质谱仪联机测定样品中的碳和氮含量。

2) 细胞内磷元素的测定

细胞内磷含量测定方法参考文献 (Fu et al., 2005)。具体而言, 取 40ml 藻液过滤至 GF/F 滤膜上 (Whatman), 然后用 2ml 浓度为 0.17M 的硫酸钠溶液润洗两次, 将膜放入含有 2ml 的 0.017M 的硫酸镁溶液的玻璃管中, 蒸发至膜干燥 (95°C), 然后放入 450°C 的马弗炉内灼烧 2h, 冷却后加入 5ml 浓度为 0.2M 的盐酸溶液, 之后放入 80°C 的烘箱 30min。经过消解后的无机磷, 在酸性介质中, 活性磷酸盐与钼酸铵反应生成磷钼黄络合物, 在酒石酸氧锶钾存在下, 磷钼黄

络合物被抗坏血酸还原为磷钼蓝络合物, 于 882nm 波长出进行分光光度测定, 具体参考海洋调查规范 (GB/T 12763.4-2007)。

具体操作如下:

a 储备液的配置

①硫酸溶液 (体积分数为 17%)

在水浴冷却和不断搅拌下, 将 60ml 硫酸 ($\rho=1.84\text{g/ml}$) 慢慢加入 300ml 的蒸馏水中, 储存于玻璃瓶中。

②钼酸铵溶液 ($\rho=30\text{g/L}$)

称取 15.0g 钼酸铵溶于水并稀释至 500ml, 储存于聚乙烯瓶中, 避光保存。

③酒石酸氧锑钾溶液 ($\rho=1.4\text{g/L}$)

称取 1.4g 酒石酸氧锑钾溶于水并稀释至 1L, 储存于聚乙烯瓶中。

④磷酸盐标准储备溶液 ($c=8.00\mu\text{mol/ml}$)

称取 1.088g 磷酸二氢钾 (优级纯, 在 110-115°C 烘干 2 小时, 至于干燥器中冷却至室温), 用少量水溶解后, 全量转移至 1000ml 容量瓶中, 用水稀释至标线, 加 1.0ml 三氯甲烷, 混匀。暗处存放。

b 工作液的配置

①硫酸-钼酸铵-酒石酸氧锑钾混合溶液

依次量取 100ml 以上配置好的储备液硫酸溶液, 40ml 钼酸铵溶液, 20ml 酒石酸氧锑钾溶液, 混合均匀。临用时配置。

②抗坏血酸溶液 ($\rho=54\text{g/L}$)

称取 5.4g 抗坏血酸溶于水并稀释至 100ml。此液储存于聚乙烯瓶中, 避免阳光直射。有效期为一星期。在 5°C-6°C 下低温保存。

③磷酸盐标准使用溶液 ($c=0.080\mu\text{mol/ml}$)

称取 1.00ml 以上配置好的标准标准储备溶液于 100ml 的容量瓶中, 用水稀释至标线。加三滴三氯甲烷, 混匀, 储存于棕色玻璃瓶中, 有效期为 24 小时。

c 标准工作曲线绘制(0-4.8 $\mu\text{mol/L}$)

①取 6 个 100ml 容量瓶, 分别移入磷酸盐标准使用工作溶液 0、0.5ml、1ml、2ml、4ml 和 6ml, 用水稀释至表标线, 混匀, 即得磷酸盐的浓度依次为 0、0.40 $\mu\text{mol/L}$ 、0.80 $\mu\text{mol/L}$ 、1.60 $\mu\text{mol/L}$ 、3.20 $\mu\text{mol/L}$ 、4.80 $\mu\text{mol/L}$ 的标准溶液系列。

②取两组各六个 50ml 反应瓶, 分别依次移入 25.0ml 上述标准系列溶液, 各加入 2.0ml 硫酸-钼酸铵-酒石酸氧锑钾混合溶液和 0.5ml 抗坏血酸, 混匀。

③显色 10min 后, 在分光光度计上, 用 10ml 比色池, 以蒸馏水作为参照液, 于 882nm 波长处测量吸光值 A_s , 其中空白吸光值为 A_b 。

④将测得的数据记录于标准工作曲线记录表中。以扣除空白吸光值后的吸光值 A_n 为纵坐标, 相应的磷酸盐浓度 C_s 为横坐标, 绘制标准工作曲线。以用线性规划求得工作你曲线截距 a 和斜率 b 。

d 样品测定

取 10ml 水样于 15ml 玻璃管中, 按照以上步骤测定样品吸光值 A_w 。将测得的数据记录于活性磷酸盐测定记录表中。

e 计算

按照以下式子计算磷酸盐的浓度:

$$C = ((A_w - A_b) - a) / b$$

其中, C 为水样中活性磷酸盐的浓度 ($\mu\text{mol/L}$), A_w 为水样的平均吸光值, A_b 为空白吸光值, a 为标准工作截距, b 为标准工作曲线斜率。

3) 细胞碳氮比值 (C:N) 和氮磷比值 (N:P)

将所测定的碳和氮的绝对含量除以对应细胞个数, 计算后得出单位细胞内碳和氮的含量, 进而计算单位细胞内的 C:N 和 N:P (mol:mol)。

4) 数据分析及作图

本研究中, 所有实验数据以“平均值±标准误”(MEAN±SE)表示 ($n=3$)。用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 其中 $p < 0.05$ 认为组间具有显著性差异。用 Sigmaplot 10.0 进行作图。

(三) 实验结果

通过实验数据分析, 我们发现 (图 6 和图 7):

1) 在磷缺乏情况下, 三个铝处理组单位固氮蓝藻细胞内氮的含量相对于对照组均显著增加 ($p < 0.05$; 图 6a); 20 μM 铝处理组单位细胞内碳含量和 C:N 明显增加 ($p < 0.05$), 但是 0.2 μM 和 2 μM 铝处理组单位细胞内碳含量和 C:N 与对照组差异性却并不明显 (图 6b, c)。三个铝处理组单位细胞内磷含量相对于对照组均显著增加 ($p < 0.05$; 图 7a), 且随铝浓度增加而逐渐增加; 而 N:P 则显著降低 ($p < 0.05$), 且随铝浓度增加而逐渐降低 (图 7b)。

2) 在磷充足情况下, 0.2 μ M 和 2 μ M 铝处理组单位细胞内碳氮含量和 C:N 明显低于对照组 ($p < 0.05$), 而 20 μ M 铝处理组与对照组差异性不明显 ($p > 0.05$; 图 6d, e, f)。铝处理组单位细胞内磷含量相对于对照组降低, 2 μ M 和 20 μ M 铝处理组单位细胞内磷含量显著降低 ($p < 0.05$; 图 7c)。2 μ M 和 20 μ M 铝处理组单位细胞内 N:P 显著增加 ($p < 0.05$), 但 0.2 μ M 铝处理组差异性不明显 ($p > 0.05$; 图 7d)。

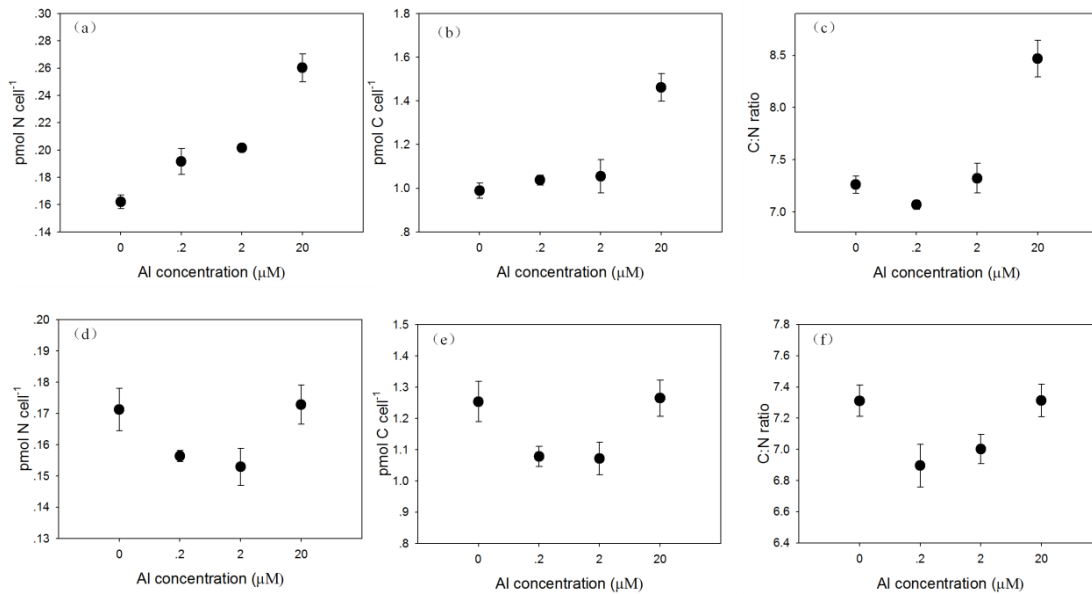


图 6 磷缺乏 (a, b, c) 和磷充足 (d, e, f) 条件下铝对该固氮蓝藻细胞内氮含量 (a, d)、碳含量 (b, e) 以及 C:N 比 (e, f) 的影响

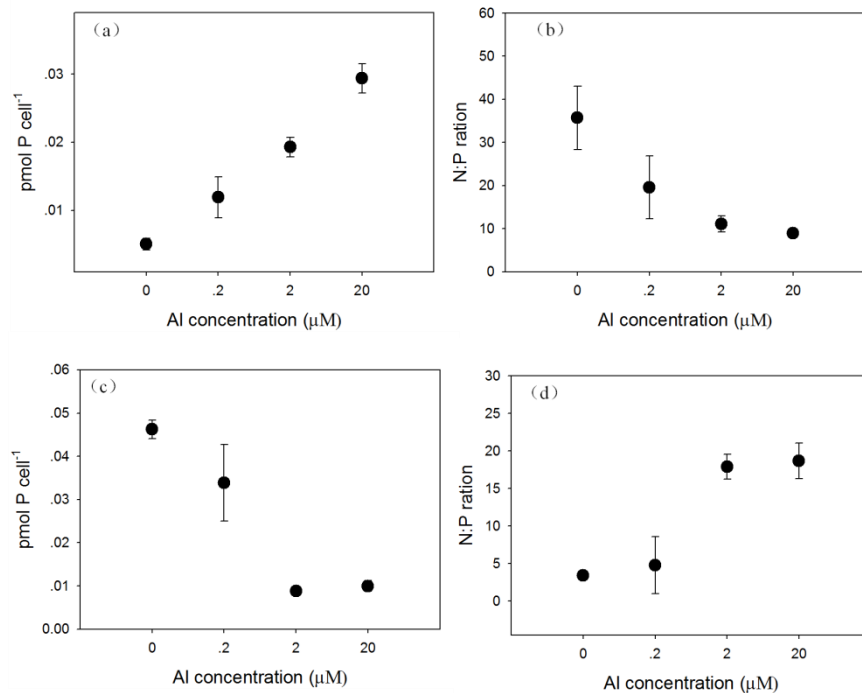


图 7 磷缺乏 (a, b) 和磷充足 (c, d) 条件下铝对固氮蓝藻细胞内磷含量 (a, c) 以及 N:P 比 (b, d) 的影响

(四) 讨论

本研究中, 在磷缺乏情况下, 铝处理后该固氮蓝藻细胞内有机碳氮和磷升高; 而在磷充足情况下, 铝处理后细胞内有机碳氮和磷降低, 表明铝对该固氮蓝藻的细胞内大量元素含量的影响同样依赖于培养基中磷的浓度水平。铝处理后, 细胞内有机氮的变化情况与细胞固氮速率的变化情况一致, 可能表明铝通过影响固氮作用进而影响了其细胞获取氮的能力; 那么, 细胞内磷的含量降低, 是否意味着铝同样影响了该固氮蓝藻获取磷的能力呢?

我们在实验结果的基础上推测, 铝可能通过影响磷的吸收最终影响该固氮蓝藻的生长速率和固氮速率。鉴于磷对固氮生物生长和固氮的重要性, 我们决定继续进行深入的研究。

但是, 细胞对磷的吸收速率不易直接测量, 而查阅文献后我们得知 *pstS* 基因的表达可以表征固氮生物获取和利用营养的能力, 细胞内磷缺乏可降低该固氮蓝藻的生长速率及其固氮速率, 同时高表达磷结合基因 *pstS*。因此我们选取 *pstS* 基因作为固氮生物对铝响应的标志, 用较为灵敏的分子生物学的方法来研究该问题, 以便从分子层面解释铝对固氮生物的影响。

实验四: 铝对固氮蓝藻 *pstS* 基因的表达的影响

(一) 器材试剂

1) 仪器耗材

超低温高速离心机 (Thermo); 涡旋振荡器; 超净工作台 (苏静); 分光光度计 (Nanodrop 2000, USA); 恒温水浴锅; 荧光定量 PCR 仪 (罗氏 480); 微量移液器 (Eppendorf); 1.5ml 无菌无核酸酶离心管 (Axygen); 移液头

2) 试剂

酵母提取物; 蛋白栋; 氯化钠; 超纯水; NaOH; HCl; 琼脂; Trizol (invitrogen); 氯仿; 异丙醇; 乙醇; DEPC 水; PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (Takara)

(二) 实验步骤

1) RNA 的提取

查阅资料后, 我们得知 RNA 酶几乎无处不在, 因此在实验中要戴口罩, 避免讲话, 并且小心谨慎, 尽量防止 RNA 被降解, 我们采用 Trizol 法提取 RNA, 步骤如下:

- a 取 30mL 藻液经微孔滤膜 (25mm, 0.45 μ m) 过滤后, 向滤膜中加入 1mL 的 Trizol, 反复吹打并室温静置 5min 后 1400rpm 离心 12min。
- b 吸取 700 μ L 藻液, 加入 200 μ L 氯仿, 涡旋振荡 40s 并室温静置 3min 后, 于 4 $^{\circ}$ C 条件下 12000rpm 离心 15min。
- c 小心吸取 300 μ L 上清液, 加入 400 μ L 异丙醇, 轻轻翻转混匀, 冰盒静置 12min 后于 4 $^{\circ}$ C 条件下 12000rpm 离心 10min。
- d 弃上清液, 加入 1mL75%的乙醇, 于 4 $^{\circ}$ C 条件下 7400rpm 离心 5min。重复一次。
- e 弃上清液, 室温凉置 3min 后加入 30 μ LDEPC 水。所得 RNA 备用。
- f 取 1.5 μ L RNA 用分光光度计 (Nanodrop 2000, USA) 测定 A260 和 A280, $1.8 \leq A260/A280 \leq 2.2$ 时, RNA 满足实验要求。

2) cDNA 的合成

我们使用 Takara 公司的 PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA, 按其上说明进行操作, 具体步骤如下:

a 基因组 DNA 的去除

试剂使用量如下表:

试剂	用量
5 \times gDNA Eraser Buffer	2 μ L
gDNA Eraser	1 μ L
Total RNA	1 μ L
RNase Free dH ₂ O	Up to 10 μ L

加完试剂后于恒温水浴锅中 42 $^{\circ}$ C 恒温 2min, 之后 4 $^{\circ}$ C 保存。

b 反转录

按下列组份在冰上配制反应液:

试剂	用量
5 \times PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4 μ L
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 μ L
RT Primer Mix	1 μ L

1) 的反应液	10 μ L
RNase Free dH2O	Up to 20 μ L

反转录反应条件为: 37 $^{\circ}$ C 15 min (反转录反应); 85 $^{\circ}$ C 5 s (反转录酶的失活反应), 分别在 PCR 上进行。

3) qPCR 定量分析

a 定量分析

基因	上游序列 (5'→3')	下游序列 (5'→3')	参考文献
<i>pstS</i>	TTGTGCAACTCAACACAGCA	TCTGTCATGGCCACATCACT	(Dyhrman and Haley, 2011)
16S	CAT CAA ACC CAG CCT CAG TTC	TTC ATG CTC TCG AGT TGC AGA	(Mohr et al., 2010)

以 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增, 以 16S 作为内参基因, *pstS* 为目的基因, 利用 LightCycler480SYBRGreen I Master (Roche, Germany) 进行扩增, 每个样品设 3 个复孔, 并设置三个不加入模板的空白对照组。反应体系为 20 μ L, 其中 10 μ L 荧光 Mix 反应液, 1 μ L 的 cDNA 模板, 正反向引物浓度最终浓度分别为 250nM, 引物如上表所示, 其余用灭菌的超纯水配齐。PCR 反应参数是: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 15s, 60 $^{\circ}$ C 退火 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10s, 45 个循环。

b 数据处理

试验中数据以平均值 \pm 标准差 (X \pm SD) 表示, 采用 SPSS18.0 (USA) 进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 显著性设为 $p < 0.05$ 。qPCR 的结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。计算公式为: $\text{Ratio} = 2^{((Cp(\text{target, test}) - Cp(\text{ref, test})) - (Cp(\text{target, control}) - Cp(\text{ref, control})))}$, 式中: $Cp(\text{target, control})$ 和 $Cp(\text{ref, control})$ 分别为对照组中目的基因 (*pstS*) 和内参基因 (16s) 的 Cp 值; $Cp(\text{target, test})$ 和 $Cp(\text{ref, test})$ 分别为实验组中目的基因和内参基因的 Cp 值。

目的基因及内参基因的扩增效率假定为 2。溶解曲线分析结果 2 个基因的融解曲线均呈现单特异峰, 表明为没有引物二聚体和非特异性产物生成, 达到相对定量 qPCR 的标准。

4) 数据分析及作图

本研究中, 所有实验数据以“平均值 \pm 标准误” (MEAN \pm SE) 表示 ($n=3$)。用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 其中 $p < 0.05$ 认为组间具有显著性差异。用 Sigmaplot

10.0 进行作图。

(三) 实验结果

通过实验数据分析, 我们发现 (图 8):

- 1) 在磷充足条件下, 相对于对照组, 铝处理组高亲磷酸盐结合蛋白基因 *pstS* 的表达量增加 ($p < 0.05$)。
- 2) 在磷缺乏情况下, 相对于对照组, 铝处理组 *pstS* 基因表达量降低 ($p < 0.05$)。

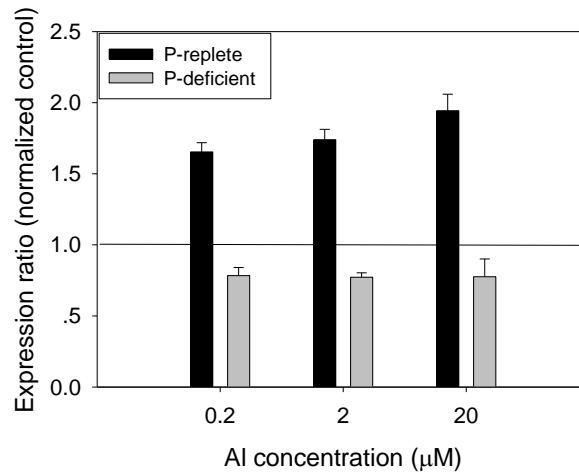


图 8 铝对 *pstS* 基因表达的影响 (以 16s 作为内参基因, 与对照组的比值)

(四) 讨论

本研究结果表明, 铝对固氮蓝藻的 *pstS* 的表达量的影响同样依赖于培养基中磷的浓度。

本研究中, 在磷充足条件下, 相对于对照组, 铝使 *Crocospaera watsonii* 单位细胞内磷含量降低, 使高亲磷酸盐结合蛋白基因 *pstS* 的表达量增加, 表明在磷充足条件下铝抑制磷吸收; 而在磷缺乏情况下, 相对于对照组, 铝使 *Crocospaera watsonii* 单位细胞内磷含量增加, 且使高亲磷酸盐结合蛋白基因 *pstS* 的表达量降低, 表明磷缺乏情况下铝可能促进磷酸盐的吸收。我们的结果可能表明, 铝可以通过影响磷的吸收进而可能影响该固氮蓝藻的生长和固氮。

三、实验结论

大气沉降向海洋表层输入大量的铝, 然而少有研究报道铝对海洋浮游植物尤其固氮生物的影响。本文以 Aquil 培养基(无氮硅营养盐)半连续培养一种单细胞海洋固氮蓝藻, 利用流式细胞仪、元素-同位素分析仪和 qPCR 技术, 探究磷充足和磷缺乏两种情况下铝对该固氮蓝藻生长和固氮作用等生理过程的影响。

1、铝对该固氮蓝藻的影响依赖于培养基中磷的浓度

具体而言, 在磷充足情况下, 铝对其生长和固氮具有抑制作用; 而在磷缺乏条件下, 铝对其生长和固氮具有促进作用。本研究结果与 Zhou 等(2016)结果一致, 后者研究表明尽管铝不影响无机磷在海水中的形态, 但在磷充足条件下, 铝处理后威氏海链藻对磷吸收速率降低, 最终使得其生长速率降低; 而在磷缺乏条件下, 铝并不影响其对磷吸收速率, 但是使其细胞内碱性磷酸酶浓度升高, 后者可以水解溶解有机磷来满足威氏海链藻对生长的需要, 因此铝最终促进威氏海链藻生长。

2、用 *pstS* 基因的表达情况来表征固氮生物获取和利用磷的能力

研究表明, 细胞内磷缺乏可降低该固氮蓝藻的生长以及磷需求, 同时高表达磷结合基因 *pstS*, 此外还可以在大量含有磷酸单脂的溶解有机磷环境中生长来应对磷缺乏。浮游植物对营养盐的获取和利用受相关基因调控, *pstS* 基因的表达情况可以表征固氮生物获取和利用磷的能力。本研究中, 在磷充足条件下, 相对于对照组, 铝使该固氮蓝藻单位细胞内磷含量降低, 使高亲磷酸盐结合蛋白基因 *pstS* 的表达量增加, 表明在磷充足条件下铝抑制磷吸收; 而在磷缺乏情况下, 相对于对照组, 铝使该固氮蓝藻单位细胞内磷含量增加, 且使 *pstS* 基因表达量降低, 表明磷缺乏情况下铝可能促进磷酸盐的吸收。

3、铝可能主要通过影响该固氮蓝藻的固氮作用和对磷的吸收进而影响其生长状态

研究表明, 在酸性环境中, 铝直接或间接影响细胞内磷代谢, 也能与铁等阳离子竞争结合位点。碱性环境中, 铝能够促进威氏海链藻对铁的吸收, 而抑制杜氏盐藻对铁吸收; 尽管铝不影响无机磷在海水中的形态, 但是铝处理后威氏海链藻对高浓度无机磷的吸收速率降低(Zhou et al., 2016)。因此我们推测, 铝可能主要通过影响该固氮蓝藻的固氮作用和对磷的吸收进而影响其生长状态。具体而言, 在磷充足情况下, 铝对其生长具有抑制作用; 而在磷缺乏条件下, 铝对其生长具有促进作用。

无疑这需要进一步的实验证实。

四、项目特色

1、科学性

(1) 方法科学

在原定试验方案的基础上,为了研究在不同磷浓度水平的环境中铝对固氮生物生长和固氮的影响,我们设置了**磷充足和磷缺乏两个处理组**分别进行实验。在发现不同磷浓度水平下铝对固氮蓝藻生长和固氮有较大影响后,我们在后续的试验中增加了对细胞中磷含量的研究以及对 *pstS* 基因表达量的研究。

(2) 结论可靠

本实验是在专家指导下,在中国科学院南海所热带海洋生物资源与生态重点研究实验室中进行的,所使用的**仪器精确**,用到的主要仪器有:流式细胞仪、元素分析仪-同位素比值质谱仪联机、分光光度计和荧光定量 PCR 仪等。同时每一个实验组除了进行三个生物学重复以外,在用仪器测量时还进行了**三个技术重复**,尽可能地减小了误差,所得到的**数据真实可靠**。

(3) 应用了分子生物学方法

为了更加准确的探究在磷缺乏和磷充足条件下铝对细胞吸收磷的影响,我们采用了灵敏度较高的分子生物学方法,通过 **qPCR 技术对高磷结合基因 *pstS* 进行了定量分析**,充分证明了:在磷充足情况下,铝对细胞吸收磷具有抑制作用;而在磷缺乏条件下,铝对其具有促进作用。

2、创新性

(1) 变量新

铝是地壳中含量最高的金属元素,普遍存在于各类水体中。同时,铝和铁一起作为大气沉降带入海洋的金属元素,尽管大量研究报道了大气沉降带了的铁对固氮生物生长和固氮产生影响,但是人们对**铝对海洋固氮生物**的影响的研究相较铁还非常少。尽管已有研究表明酸性水体中铝对浮游生物和鱼类等都有毒害作用,但是海水作为偏碱性水体,对于其中的铝,人们还研究较少。而铝对固氮蓝藻影响的研究,则少之又少。

(2) 材料新

传统上认为,束毛藻是最主要的固氮生物类群,随着分子生物学的发展,逐渐发现单细胞

固氮蓝藻（尤其单细胞类群 B 和类群 A）的丰度和固氮量也相当重要。*Crocospaera watsonii* 属于单细胞固氮蓝藻 B 类群，已经在野外分离并在实验室培养多年。本实验采用 WH0003 株系作为藻种，自 2000 年在北太平洋的 ALOHA 站位分离出来后，已经成功在实验室培养多年，其生长速率较快且基因组已经被测序，是研究海洋固氮生物的重要模式种之一。基于野外实验铝对两种固氮蓝藻束毛藻和 UCYN-A 的结果，本实验采用 *Crocospaera watsonii* WH0003 株系作为单细胞固氮蓝藻的代表，以探讨铝是如何影响固氮蓝藻的固氮作用。

（3）方法新

我们采用了分子生物学的方法，运用 qPCR 技术测定了细胞中 *pstS* 基因的表达量，并且推断出铝可能影响该固氮蓝藻对磷的吸收，得出在磷充足情况下，铝对该固氮蓝藻生长和固氮等具有抑制作用；而在磷缺乏条件下，铝对该固氮蓝藻生长和固氮具有促进作用的结论。

（4）新发现

在本次试验中，我们惊奇地发现在磷缺乏和磷充足两种条件下，铝对固氮蓝藻的生长速率、固氮速率、细胞中碳、氮和磷含量以及 *pstS* 基因的表达量都呈现截然不同的结果。在磷充足条件下铝处理组固氮蓝藻的生长速率、固氮速率、细胞内碳、氮和磷含量以及 *pstS* 基因表达量都明显降低。而在磷缺乏情况下，铝处理后固氮蓝藻的生长速率、固氮速率、细胞内碳、氮和磷含量以及 *pstS* 基因表达量都明显上升。尽管已有不多的文献报道了铝对海洋浮游植物的影响，但我们的研究可能是铝对海洋固氮蓝藻影响的首次报道，为揭示铝对自然海水中固氮生物生长和固氮的影响提供研究基础。

3、实用性

（1）推广范围

我们通过搜集资料选择了除“0”以外 3 个具有代表性的铝浓度（分别代表自然海水中的最大铝溶解浓度、河口区域最大铝浓度和海水中最大铝溶解浓度），可以反映在不同的水域中单细胞固氮蓝藻受到铝的影响，并借此反映在这些环境条件下固氮蓝藻整体受到的影响，使不同水域中氮循环速率的评估变得更为简易。

（2）经济价值

固氮蓝藻作为氮循环中产生“新氮”的重要一环，对海洋中有机氮的含量起至关重要的作用。通过调节铝和磷的浓度关系，可以提高海洋中的有机氮含量，提高海产养殖的产量，增加

了人工调节或预测其固氮速率从而调控氮循环的可行性，从而为具体的生产工作提供方便。

(3) 理论价值

由于国内极少在这方面进行研究，我们的研究可能成为国内对这方面研究的前导，试验方法及结论都具有一定的借鉴意义，在提供对固氮蓝藻更深入的认识的同时，可以为后续对海洋固氮蓝藻生长节律及固氮速率的研究提供理论基础，同时也成为铝对海洋固氮蓝藻相关研究的基石。

参考文献

- 1.林峰, 2014. 中国边缘海生物固氮速率的时空分布及其影响因素. 厦门: 厦门大学: 1-194.
- 2.任景玲, 2010. 长江流域及黄、东海铝的生物地球化学循环及其影响因素研究. 青岛: 中国海洋大学: 1-164
- 3.沈国英, 黄凌风, 郭丰, 等. 2010. 海洋生态学. 北京: 科学出版社.: 1-360
- 4.史荣君, 李志红, 谭焯辉, 等. 2016. 溶解态铝对海洋浮游植物群落结构及聚球藻生长的影响. 南方水产科学, 12(1): 1-8.
- 5.张润, 2010. 中国边缘海生物固氮作用研究. 厦门: 厦门大学: 1-220.
- 6.中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, 2007. GB/T 12763.6-2007 海洋调查规范 第 4 部分: 海水化学要素调查.
- 7.Dyhrman ST and Haley ST (2011) Arsenate resistance in the unicellular marine diazotroph *Crocospaera watsonii*. *Frontiers in Microbiology* 2.
- 8.Fu FX, Zhang YH, Bell PRF and Hutchins DA (2005) Phosphate uptake and growth kinetics of *Trichodesmium* (Cyanobacteria) isolates from the North Atlantic Ocean and the Great Barrier Reef, Australia. *J Phycol* 41(1): 62-73.
- 9.Mohr W, Intermaggio MP and LaRoche J (2010) Diel rhythm of nitrogen and carbon metabolism in the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Crocospaera watsonii* WH8501. *Environ Microbiol* 12(2): 412-421.
- 10.Zhou L, Tan Y, Huang L and Wang W-X (2016) Enhanced utilization of organic phosphorus in a marine diatom *Thalassiosira weissflogii*: A possible mechanism for aluminum effect under P limitation. *J Exp Mar Biol Ecol* 478: 77-85.