

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810025002.0

[51] Int. Cl.

C02F 1/00 (2006.01)

C02F 1/30 (2006.01)

[43] 公开日 2008年9月17日

[11] 公开号 CN 101264944A

[22] 申请日 2008.4.28

[21] 申请号 200810025002.0

[71] 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路22号

[72] 发明人 谷孝鸿 林必桂 杨柳燕 肖琳

曾巾 王晓蓉

[74] 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

代理人 柏尚春

权利要求书1页 说明书7页 附图3页

[54] 发明名称

一种控制蓝藻水华的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种控制蓝藻水华的方法，其特征在于采用添加赖氨酸并实施人工光照的方式。本发明的方法简单易行，通过光照可极大的促进赖氨酸的抑藻效果，控制水华作用明显。

-
- 1、一种控制蓝藻水华的方法，其特征在于采用添加赖氨酸并实施光照的方式。
 - 2、根据权利要求1所述的控制蓝藻水华的方法，其特征在于所述赖氨酸的加入量为 $3-5 \text{ g/m}^3$ 。
 - 3、根据权利要求1所述的控制蓝藻水华的方法，其特征在于所述的光照包括白天自然光和人工补光。
 - 4、根据权利要求1所述的控制蓝藻水华的方法，其特征在于所述的人工补光为水面上白炽灯补光或/和水面下白炽灯补光。

一种控制蓝藻水华的方法

技术领域

本发明涉及环境保护技术领域，具体涉及一种控制蓝藻水华的方法。

背景技术

水华是淡水中的一种自然生态现象，只是仅由藻类引起的，如蓝藻、绿藻、硅藻等，也就是水的富营养化。水华发生时，水一股呈蓝色或绿色。这种在自然界就有的水华现象，在我国古代历史上就有记载。在自然界中它们很快消失，并没有给水产动物和人类带来危害。水华可以说是湖泊地区的“赤潮”现象。

淡水中富营养化后，水华频繁出现，面积逐年扩散，持续时间逐年延长。太湖、滇池、巢湖、洪泽湖都有水华，就连流动的河流，如长江最大支流——汉江下游汉口江段中也出现水华。淡水中水华造成的最大危害是：饮用水源受到威胁，藻毒素通过食物链影响人类的健康，蓝藻水华的次生代谢产物 MCRST 能损害肝脏，具有促癌效应，直接威胁人类的健康和生存。此外，自来水厂的过滤装置被藻类水华堵塞，漂浮在水面上的水华影响景观，并有难闻的臭味。

当藻类大量生长时，这些藻类能释放出毒素——湖靛，对鱼类有毒杀作用。藻类大量死亡后，在腐败、被分解的过程中，也要消耗水中大量的溶解氧，使水体严重恶臭。而造成水华现象的出现，主要原因还是水域沿线大量施用化肥、居民生活污水和工业废水大量排入江河湖泊，致使江河湖泊中氮、磷、钾等含量上升。

湖泊富营养化依然是我国目前以及今后相当长一段时期内的重大水环境问题。寻求一种高效控制蓝藻水华的方法迫在眉睫。目前，控制湖泊富营养化藻类暴发的技术包括物理法、化学法、生物法和生态修复工程法等。物理法有底泥疏浚、稀释或调水、藻类过滤与捞取、粘土法等，化学法有投加杀藻剂、抑藻剂等，生物法有微生物控藻、原生动植物控藻、大型水生植物控藻和鱼类的投放等，生态修复工程法有草型生态系统构建、生态调控等技术。各种方法各有优缺点和使用的局限性，有的不适合大型湖泊，有的有二次污染，有的经济性较弱，因此，在我国湖泊富营养化日趋严重的今天，开发环境友好的藻华控制技术非常具有必要。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是提供一种控制蓝藻水华的方法。

为解决上述技术问题，本发明采用的技术方案如下：

一种控制蓝藻水华的方法，采用添加赖氨酸并实施光照的方式。

其中，所述赖氨酸的加入量为 3-5 g/m³。

其中,所述的光照包括白天自然光和人工补光。所述的人工补光为水面上白炽灯补光或/和水面下白炽灯补光。采用人工晚间补光(白灯)可提高抑藻的效果;采用水下补光,可提高光利用效率,达到高效的抑藻效果。

有益效果:本发明的控制蓝藻水华的方法简单易行,通过光照可极大的促进赖氨酸的抑藻效果,控制水华作用明显。

附图说明

图 1 为赖氨酸抑制铜绿微囊藻的半致死浓度 (EC₅₀)。

图 2 为赖氨酸对铜绿微囊藻生长的影响。

图 3 为赖氨酸对铜绿微囊藻可溶性蛋白质含量的影响,其中*表示与 0mg/L 对照组差异显著, P<0.05; **表示差异极显著, P<0.01, 以下相同。

图 4 为赖氨酸对铜绿微囊藻 SOD 酶活性的影响。

图 5 为赖氨酸对铜绿微囊藻 MDA 含量的影响。

图 6 为赖氨酸对铜绿微囊藻 Ca²⁺Mg²⁺-ATPase 活性的影响。

图 7 为光照条件下赖氨酸对铜绿微囊藻叶绿素 a 含量的影响。

图 8 为黑暗条件下赖氨酸对铜绿微囊藻叶绿素 a 含量的影响。

图 9 为弱光照条件下赖氨酸对铜绿微囊藻叶绿素 a 含量的影响。

具体实施方式:

实施例 1: 赖氨酸和光照联合作用控制水华试验

2007 年 6 月在太湖边,分别在直径为 50cm 的塑料桶中,添加 90 L 湖水和铜绿微囊藻,起始藻密度为 1.3×10⁶ cell/L,加入赖氨酸范围为 0-5 mg/L,同时在每个桶中水下中间悬挂 40w 防水白炽灯进行补光。以不添加赖氨酸相比,96h 后能有效抑制铜绿微囊藻的生长,在赖氨酸浓度为 5 mg/L,铜绿微囊藻密度为空白对照的一半,体现出其控藻的能力,结果见表 1。

表 1 赖氨酸和光照联合作用控制蓝藻暴发试验结果(藻液 OD 值)

添加时间(h)	赖氨酸浓度			
	0 (mg/L)	1.2(mg/L)	2.0(mg/L)	5.0(mg/L)
0	0.15	0.15	0.15	0.15
24	0.22	0.24	0.18	0.18
96	0.47	0.45	0.33	0.23

同时,多次重复试验,发现:(1)新鲜配置的赖氨酸,在处理 48 小时后,5mg/L 的水平即可杀灭微囊藻;(2)放置一段时间后的赖氨酸,作用效果时间延迟,作用剂量上升—可能跟赖氨酸分解有关。通过对赖氨酸半致死浓度 (EC₅₀) 的研究,表明赖氨酸

酸半致死浓度 (EC₅₀) 为 2.6mg/L, 结果见图 1。

实施例 2: 赖氨酸和光照联合作用控制水华机理研究

1 材料和方法

1.1. 藻种和培养基: 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* FACHB469) 由中科院武汉水生生物研究所提供。试验采用 BG11 培养基, 250ml 锥形瓶内装 150ml 藻液。取对数生长期的藻液接种, 接种初时密度为 1.5×10^6 cell/ml 左右。培养条件: 温度 25℃, 光暗比 12h:12h, 光照度 2200 Lx。赖氨酸配成母液后经 0.22μm 滤膜过滤灭菌, 4℃ 存放; 当藻种接入培养基后, 按比例把赖氨酸加入藻液中。

1.2. 铜绿微囊藻生长曲线的测定: 测铜绿微囊藻培养液的光密度 OD_{460nm} 和用血小球计数板计数铜绿微囊藻的浓度, 获得光密度 (x) 与细胞数量 (y) 的线型方程为 $y = 8 \times 10^{-8}x + 0.0166$, ($r^2 = 0.997$)。

1.3. 生理生化指标的测定:

1.3.1. 可溶性蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法。

1.3.2. 酶活性的测定:

粗酶液的制备: 取各处理组藻液 20 ml, 4℃、10000 rpm 冷冻离心 10 min, 去上清液, 加入 3 ml 缓冲溶液 (测 SOD 和 MDA 用 PBS 缓冲液, 0.05M, pH 7.0, 4℃ 预冷; 测 ATPase 用 STN 缓冲液, pH 7.8, 含 0.05 mol/L Tris-HCl、0.4 mol/L 蔗糖、0.01mol/L NaCl, 4℃ 预冷), 冰浴下超声破碎 (3min, 5s, 5s), 在 4℃、7000 rpm 冷冻离心 10 min, 上层清液即为粗酶液, 用于酶活性测定。

SOD 酶活性测定采用氮蓝四唑(NBT)法; MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法; $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATPase 活性测定采用南京建成生物工程研究所提供的 ATP 酶测试盒。

1.3.3. 叶绿素 a 含量测定采用 95%乙醇低温暗处提取, 后分光光度法测定。

1.3.4. 藻胆蛋白含量测定: 取各处理组藻样 20 ml, 10000 rpm 离心 5min, 去上清液后, 加入 3 ml PBS (0.05M, pH 6.8), 放入低温冰柜中(-86℃)冷冻 8h, 然后暗处解冻, 如此反复冻融 3 次, 再 7000rpm 离心 10min, 上清液用酶标仪测定 620nm, 650nm, 565nm 下的光吸收值, 按下式计算藻胆蛋白各组分含量:

$$\text{藻蓝蛋白(PC, mg/L)} = (\text{OD}_{620} - 0.7 \times \text{OD}_{650}) / 7.38;$$

$$\text{别藻蓝蛋白(APC, mg/L)} = (\text{OD}_{650} - 0.19 \times \text{OD}_{620}) / 5.65;$$

$$\text{藻红蛋白(PE, mg/L)} = [\text{OD}_{565} - 2.8(\text{PC}) - 1.34(\text{AP})] / 1.27。$$

1.4. 实验数据采用 SPSS 13.0 软件包进行独立样本 T 检验统计分析, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果及讨论

2.1 赖氨酸对铜绿微囊藻生长的影响

由图 2 可知,以不同浓度赖氨酸处理的铜绿微囊藻在 24 h 内会继续生长。在 24 h 之后,0.6 mg/L 赖氨酸对微囊藻没有显著影响;2.0mg/L 赖氨酸对微囊藻有微弱的抑制作用;而 5.0 mg/L 和 10.0 mg/L 赖氨酸开始明显抑制微囊藻的生长,在 96h 时大部分藻细胞被抑制。由图 3 可知,藻细胞可溶性蛋白质含量被抑制过程与藻细胞类似,在 96h 时镜检可以看到大部分藻细胞发生裂解。

利用赖氨酸处理微囊藻时,24 h 内各浓度处理的藻液颜色没有明显变化;而 48 h 之后,5.0 mg/L 和 10.0 mg/L 处理的藻液开始变白、变黄,96 h 后培养液逐渐变成乳白色,甚至出现藻体结块、粘壁现象,藻细胞大量破裂死亡。喻国策等提到乳酸、柠檬酸、谷氨酸和甘氨酸这四种有机物的存在对鱼腥藻 7120 (*Anabaena* sp.7120) 的生长有抑制作用,在培养 6d 后,培养液渐趋无色【喻国策,丛威,蔡昭铃等.有机碳化合物对鱼腥藻 7120 生长的影响[J].水生生物学报,2003,27(3):238-242.】。这与本试验结果很一致,因此可推测某些酸性有机物对蓝藻细胞可能存在相似的抑制机理。

2.2 赖氨酸对铜绿微囊藻抗氧化系统的影响

由图 4 可知,不同浓度赖氨酸在 48h 内对微囊藻细胞的 SOD 酶活性没有影响,而在 96 h 时,5.0 mg/L 和 10.0 mg/L 赖氨酸显著抑制它的活性。由图 5 可知,在 24 h 时不同浓度赖氨酸对微囊藻 MDA 含量没有影响,而 5.0 mg/L 和 10.0 mg/L 赖氨酸在 48h 时使微囊藻细胞 MDA 含量显著下降,96 h 时则极显著下降。根据图 2 和图 3 的分析,5.0 mg/L 和 10.0 mg/L 赖氨酸从 24 h 时开始抑制微囊藻细胞的生长,而藻细胞的 SOD 酶活性在 48h 内没有显著变化、MDA 含量在 48h 时没有升高而反而下降,说明赖氨酸并没有抑制藻细胞的 SOD 酶活性,也没有诱发藻细胞产生 MDA。48h 时作为酯质过氧化产物的 MDA 含量的下降、96h 时 SOD 酶活性的下降应是藻细胞本身趋于死亡、裂解而引起的。SOD 是细胞体内消除活性氧自由基最关键的酶类之一;MDA 是酯质过氧化的关键产物,它基本上代表了细胞酯质过氧化的程度。由以上分析可知,赖氨酸不是通过诱导藻细胞产生自由基从而进一步损伤藻细胞这一途径来抑制微囊藻的。

2.3 赖氨酸对铜绿微囊藻 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性的影响

由图 6 可知,在 24 h 时不同浓度赖氨酸对微囊藻细胞的 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性没有影响,48 h 和 96 h 时 5.0 mg/L 和 10.0 mg/L 赖氨酸则极显著抑制藻细胞的 ATP 酶活性。 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 存在生物细胞多个部位,如细胞质膜上和内囊体上,对细胞营养物质的转运和光合作用起着重要作用。Hehmann (2002)认为,赖氨酸可能通过抑制微囊藻细胞的 ATP 酶活性或磷酸循环,从而抑制了微囊藻对钙、镁或其它矿质元素的吸收,进而引起微囊藻细胞的裂解。由图 6 的分析可知,赖氨酸对微囊藻细胞的 ATP 酶活性抑

制极为显著，因此，ATP 酶可能是赖氨酸对微囊藻细胞起抑制作用的一个靶位点。

2.4 赖氨酸对铜绿微囊藻光合作用系统的影响

由图 7 可知，在光照条件下，从 24h 开始 5.0mg/L 和 10.0mg/L 赖氨酸即对微囊藻叶绿素 a 含量具有极显著的抑制作用。由表 2 可知，在 48h 时，藻胆蛋白各组分中藻蓝蛋白 (PC) 相对含量下降，藻红蛋白 (PE) 相对含量增高，别藻蓝蛋白 (APC) 相对含量不变。说明光照条件下，5.0mg/L 和 10.0mg/L 赖氨酸会影响藻细胞藻胆蛋白组分构成，其作用点在于藻蓝蛋白 (PC) 和藻红蛋白 (PE)。藻胆蛋白是蓝藻光合作用捕光天线的主要功能团，位于捕光天线——藻胆体内，它包括 PC 和 APC 和 PE 三种蛋白，具有捕获光能并将能量高效传递给光系统 II (PS II) 反应中心——叶绿素 a 的功能。因此，微囊藻藻胆蛋白组分构成的变化会直接影响到它的光反应效率。

表 2 光照条件下，48h 时铜绿微囊藻藻胆蛋白各组分量

赖氨酸(mg/L)	PC (%)	APC (%)	PE (%)
0	20.78±1.02	17.90±0.40	61.32±1.42
2.0	19.20±0.54	17.74±0.35	63.06±0.85
5.0	5.39±0.49**	19.83±3.26	74.78±3.48**
10.0	6.41±0.55**	20.39±3.41	73.19±3.52**

(*表示与 0mg/L 对照组差异显著, P<0.05; **表示差异极显著, P<0.01; 以下同)

试验中发现，在黑暗条件下（将培养微囊藻的锥形瓶用铝箔严密包裹，置于光照培养箱内培养），96 h 内不同浓度赖氨酸对微囊藻均无明显的抑制作用，直到一星期以后藻液才逐渐变黄死亡。据报道铜绿微囊藻在黑暗条件下具有利用有机底物进行化能异养生长的能力。由图 8 可知，在 96 h 之内，黑暗条件下不同浓度的赖氨酸对微囊藻叶绿素 a 含量没有抑制作用，其中 2.0 mg/L 赖氨酸处理的叶绿素 a 含量出现显著增加。由表 3 可知，赖氨酸对微囊藻藻胆蛋白组分构成没有影响。说明在黑暗条件下，微囊藻具有利用赖氨酸进行化能异养生长的能力，但是此能力很微弱，不足于维持藻细胞的持久生长。

表 3 黑暗条件下，96h 时铜绿微囊藻藻胆蛋白各组分量

赖氨酸(mg/L)	PC (%)	APC (%)	PE (%)
0	19.85±1.08	20.43±0.16	59.72±0.93
2.0	19.48±1.29	20.29±0.71	60.23±1.99
5.0	20.02±0.84	19.87±0.34	60.11±1.13
10.0	17.88±0.84	19.70±1.35	62.41±0.69

试验中还发现,在微弱光照条件下(光照度 600Lx~1100Lx),不同浓度赖氨酸对微囊藻也没有抑制作用,因此笔者对微囊藻在弱光照条件下利用赖氨酸的能力,即其光异养生长能力进行了研究。光异养生长可以通过在含有有机碳源的培养基中加入合适浓度的光合作用抑制剂——二氯苯基二甲基脲(DCMU)来实现。此时细胞光合作用系统 II (PSII) 的活性被抑制,非环式电子传递被阻止, NADPH 不再产生, CO₂ 不再被还原同化,但光系统 I (PSI) 仍在起作用,细胞仍可通过环式磷酸化进行 ATP 的合成。实验表明 10 μmol/L DCMU 即可完全抑制微囊藻生长。接种后,加入赖氨酸的同时加入 10 μmol/L DCMU,并在弱光照条件下培养,并以正常光照条件下 10 μmol/L DCMU 处理作为空白对照。由图 9 和表 4 可知,各处理组与 DCMU 空白对照对微囊藻叶绿素 a 含量和藻胆蛋白组分构成的影响情况是基本一致的。因此,在弱光照条件下起抑制作用的是 DCMU,即微囊藻在弱光照条件下不能通过 PSI 系统来维持生长,它没有利用赖氨酸进行光异养生长的能力。

由以上分析可知,赖氨酸对微囊藻光合作用系统中的叶绿素 a 含量、藻胆蛋白组分构成以及 Ca²⁺Mg²⁺-ATPase 活性都具有显著影响;光照条件是赖氨酸对微囊藻起抑制作用的一个敏感条件,也说明光合作用系统是赖氨酸抑制微囊藻的一个作用位点。

表 4 弱光照条件下, 96h 时铜绿微囊藻藻胆蛋白各组分含量

赖氨酸浓度(mg/L)	PC (%)	APC (%)	PE (%)
0	24.66±0.75	15.93±0.15	59.41±0.60
2.0	17.45±0.27**	18.88±0.47**	63.67±0.64**
5.0	17.83±1.24**	19.08±0.34**	63.09±0.98**
10.0	16.91±0.44**	18.13±0.45**	64.96±0.42**
DCMU (对照)	19.62±0.11	20.89±0.10**	59.49±0.03

3 讨论

蓝藻除了可以利用 NO₃⁻等无机氮源进行生长,也可以利用一些有机氮进行生长,如 Neilson & Larsson 研究了 7 种蓝藻对有机氮作为唯一氮源的生长情况,结果发现这 7 种蓝藻只能利用尿素、尿酸盐和少数一些氨基酸(谷氨酸、天门氨酸、精氨酸和鸟氨酸)进行生长;另外一些单细胞蓝藻(如 *Synechococcus* PCC 7002)利用有机氮源的范围较广,可以利用大部分的氨基酸。但是某些氨基酸也可以对蓝藻的生长起抑制作用,如苯丙氨酸可以抑制 *Synechocystis* sp. 29108 的生长,不过其抑制机理目前并不清楚。一般来说,化学物质的抑藻机理主要是抑制细胞壁的合成、酶活性或者光合作用。本试验发现外加的 L-赖氨酸对铜绿微囊藻的抑制作用主要表现在抑制其光合作用。

蓝藻是原核生物，细胞内无叶绿体，但是有非垛叠类囊体，类囊体表面结合藻胆体，PSI、PSII、Cytb6/f 复合体和 ATP 合成酶等 4 种蛋白都在类囊体上。光合作用的光反应，即光化学反应、电子传递和光合磷酸化就是在 4 种复合体上进行的。PSI 和 PSII 是多亚基蛋白，主要包括天线系统和反应中心部分，前者的主要作用是捕获光能，而后者主要是利用前者捕获的光能进行原初光化学反应。在光照条件下，赖氨酸对光反应中心叶绿素 a 具有显著的抑制作用；在黑暗条件下，赖氨酸对铜绿微囊藻不起抑制作用，且 PSI 不能单独维持藻细胞的持久生长，说明 PSII 的损伤是赖氨酸抑制微囊藻生长的重要原因。一般情况下，PSII 受损伤的部位有 PSII 氧化侧、PSII 反应中心或者 PSII 原初电子受体。赖氨酸可能抑制了微囊藻的 PSII 反应中心，扰乱了 D1 蛋白周转，降低反应中心的光反应效率，使得天线系统捕获的大部分光能只能以热辐射形式耗散，即微囊藻利用光的效能降低，其半饱和光强可能下降，因此正常光照的光照强度在此时可能超过光反应的界限而产生光抑制。

外加 L-赖氨酸在光照条件下使微囊藻的 PC 相对含量下降、PE 相对含量升高，而黑暗条件对藻胆蛋白组分构成没有影响，说明光照条件是赖氨酸影响藻胆蛋白组分构成的影响因子。由于不同的光质和光强可以引起蓝藻藻胆蛋白的类型和含量的变化，蓝藻可以通过改变藻胆蛋白的组分和含量来有效地捕获光能，因此当 PSII 受到损伤、光反应效率降低时，可能会诱发光反应的天线系统—藻胆蛋白通过调节其组分构成来适应这一变化。由以上分析可推测，外加 L-赖氨酸可能主要通过抑制微囊藻细胞的 PSII 反应中心，以及抑制光反应中心叶绿素 a 的含量、扰乱藻胆蛋白组分构成等，使微囊藻的光合作用系统受到破坏。

PSI 和 PSII 之间的电子传递过程中会在光合膜两侧建立质子电化学梯度，它可以驱动 ATP 酶合成 ATP。因此，当 PSII 受到损伤时，会使这种 ATP 合成缺乏驱动能量，导致 ATP 酶活性降低。另外一方面，由于在活体中不管是氧化磷酸化还是光合磷酸化，ATP 合成均与电子传递耦联，因此 ATP 合成受到抑制反过来也会导致细胞内电子传递链受到限制，由此可能进一步导致细胞功能紊乱，如抑制细胞对钙镁等矿质元素的吸收等，进而使细胞生长受到抑制。

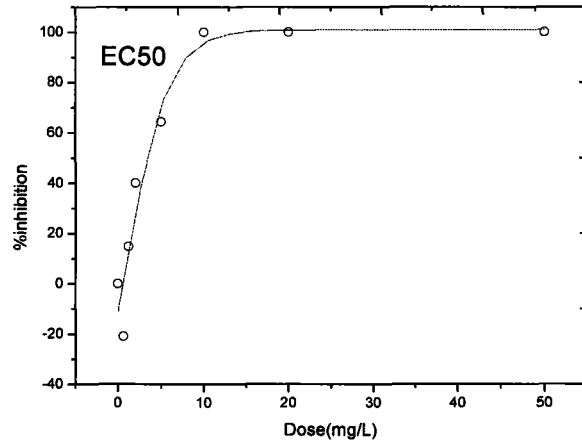


图 1

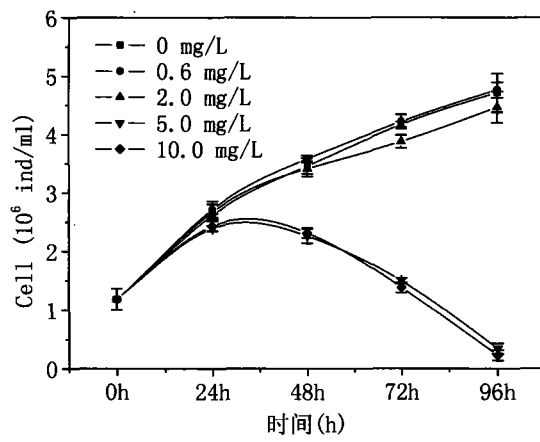


图 2

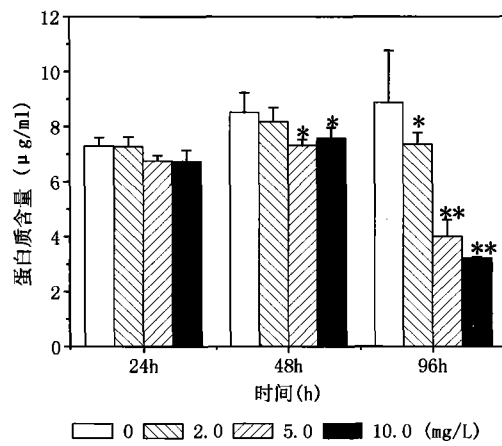


图 3

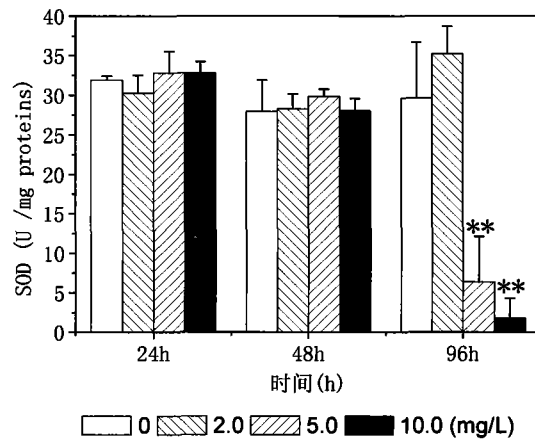


图 4

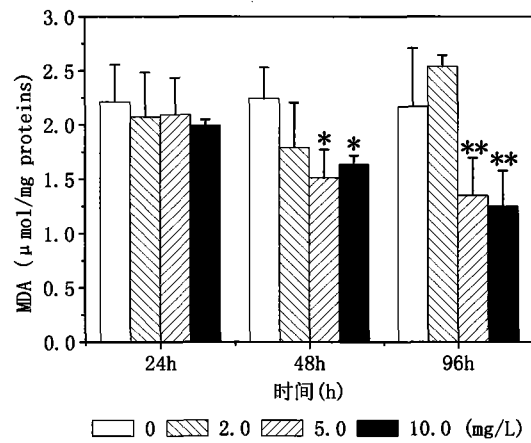


图 5

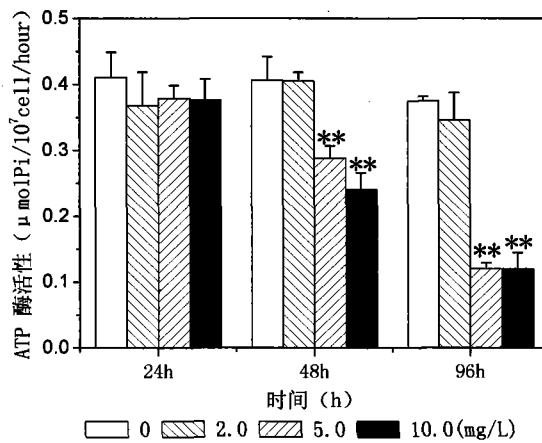


图 6

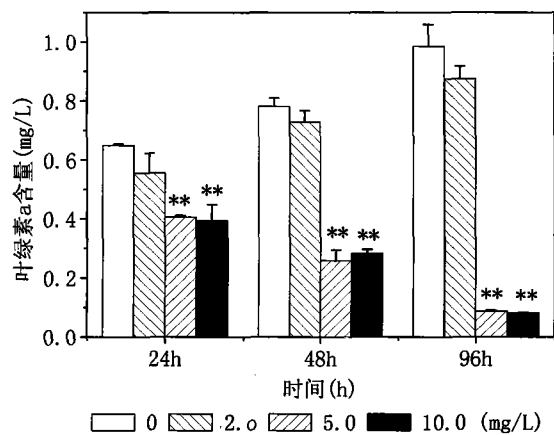


图 7

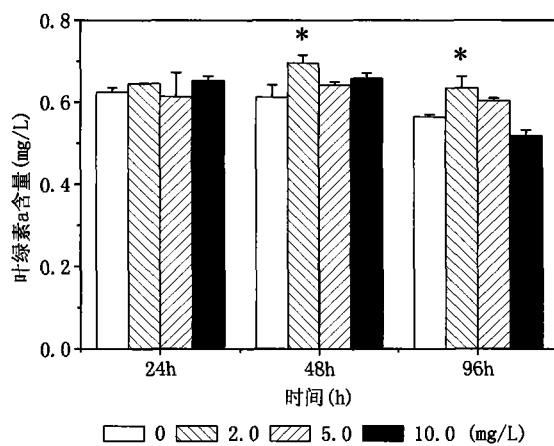


图 8

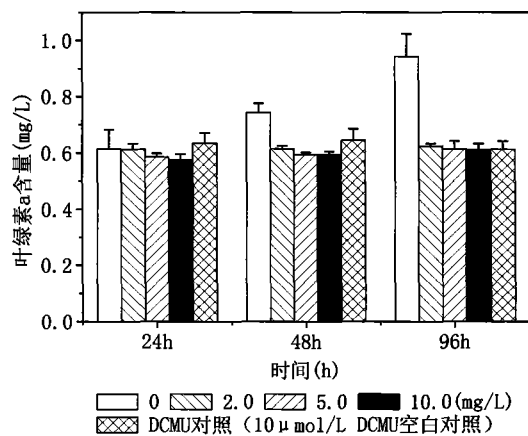


图 9