

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2018062901

刘瑀, 李娜, 刘宇馨, 等. 溢油对小新月菱形藻氨基酸相对含量变化的影响[J]. 环境化学, 2019, 38(2): 363-369.

LIU Yu, LI Na, LIU Yuxin, et al. Effects of oil spill on the relative abundances of amino acids in *Nitzschia closterium* [J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(2): 363-369.

溢油对小新月菱形藻氨基酸相对含量变化的影响*

刘瑀^{1,2**} 李娜¹ 刘宇馨¹ 娄亚迪¹

(1. 大连海事大学环境科学与工程学院, 大连, 116026; 2. 大连海事大学环境信息研究所, 大连, 116026)

摘要 以小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)为受试生物,在96 h急性毒性实验条件下,设置不同浓度的180#燃料油分散液(WAF),分析小新月菱形藻细胞内氨基酸相对含量的变化.结果表明,随着培养时间增加,对照组(Ctrl)和低浓度WAF(1%和3%)中丙氨酸和组氨酸相对含量呈上升趋势,而在高浓度WAF(5%、7%和10%)组中丙氨酸无明显变化趋势,组氨酸则呈先降低后升高的趋势.在对照组和低浓度WAF组(1%和3%)下,半胱氨酸相对含量随培养时间增加而减少,而高浓度WAF(5%、7%和10%)下,变化趋势与低浓度相反.在各WAF浓度下,脯氨酸相对含量均随着培养时间的增加而增加,而天冬氨酸的变化正好与脯氨酸相反.因此,本研究发现小新月菱形藻内的主要氨基酸对180#燃料油分散液具有敏感的生化反应,可作为海洋污染检测的一种新途径.

关键词 氨基酸,小新月菱形藻,WAF,溢油.

Effects of oil spill on the relative abundances of amino acids in *Nitzschia closterium*

LIU Yu^{1,2**} LI Na¹ LIU Yuxin¹ LOU Yadi¹

(1. College of Environmental Science and Engineering, Dalian Maritime University, Dalian, 116026, China;

2. Environmental Information Institute, Dalian Maritime University, Dalian, 116026, China)

Abstract: *Nitzschia closterium* (*N. closterium*) was selected as the test organism to study the toxicity effects of 180 # fuel oil water accommodated fractions (WAF) during the exposure time of 96 h in the present study. The relative abundance of amino acids in the cells of *N. closterium* were measured. The results showed that the relative abundance of alanine (Ala) and histidine (His) increased with increasing culture time in the control group and low WAF concentrations (1% and 3%). However, the change of Ala was not obvious in the high WAF concentrations (5%, 7% and 10%), and the abundance of His first decreased and then increased. The relative abundance of cysteine (Cys) in the control group and low WAF concentrations (1% and 3%) decreased with the increase of culture time, while variation trend was opposite in the high WAF concentrations (5%, 7% and 10%). The relative abundance of proline (Pro) increased with increasing culture time in all the WAF concentrations, and the change of aspartic acid (Asp) was just opposite to the trend of Pro. The study shows that the main amino acids in *N. closterium* are sensitive to the 180 # fuel oil WAF,

2018年6月29日收稿(Received: June 29, 2018).

* 国家科技支撑计划(2015BAD17B05)和中央高校基本科研业务费专项资金资助.

Supported by the National Science & Technology Pillar Program (2015BAD17B05) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities.

** 通讯联系人, Tel: 18041153998, E-mail: ylsibo@foxmail.com

Corresponding author, Tel: 18041153998, E-mail: ylsibo@foxmail.com

which can serve as the new approach to monitor the marine pollution caused by the oil spill.

Keywords: amino acid, *Nitzschia closterium*, WAF, oil spill.

随着海上溢油事件日益频繁发生,石油泄漏对海洋造成了极大的危害^[1].目前关于石油污染对海洋微藻的毒性效应研究,主要集中在原油、原油分散剂以及相关原油产品对海洋微藻的急性毒性试验,如高祥等^[2]研究海洋微藻在石油烃类污染物下 96h-EC₅₀毒性效应;袁萍等^[3]探究 0 #柴油对微藻的生长动力学模型;马帅等^[4]研究海洋微藻的叶绿素和超氧化物歧化酶在原油和溢油分散剂下的毒性效应.但此类研究主要注重于细胞生长率、叶绿素 a 含量、及 EC₅₀等参数和极少数的生理生化指标的探究,然而这些参数并不足以说明溢油对微藻的毒性作用机理.

研究表明石油烃会影响海洋浮游植物体内蛋白质的合成速率,从而反映生物体的代谢和生长状况^[5].氨基酸是蛋白质的基本组成单位,在细胞组织的代谢、生长、维护和修复过程中发挥着举足轻重的作用^[6].曹淑莉等^[7]探究 8 种微藻氨基酸组成比例及对虾早期幼体氨基酸组成,发现微藻作为对虾饵料,必需氨基酸组成成分比例才是决定饵料价值的一个重要因素.氨基酸逐渐成为研究海洋变化和海洋污染的最全面的单一化合物,当海洋微藻受到溢油污染时,石油烃在细胞膜系统中积累,干扰膜上反应系统进而影响光合作用过程^[8],导致细胞中的糖酵解等过程受到影响,最终影响氨基酸的合成和转化.因此通过测定溢油对海洋微藻氨基酸含量的影响,可为探索溢油对微藻毒性作用机理提供新的思路.

溢油对海洋生态的影响主要归因于所含多环芳烃类化合物的毒性,一般来说溶解分散于水体中的石油烃组分(water accommodated fraction, WAF)^[9]是直接影响生物体的毒性源.本实验选用 180 #燃料油分散液(WAF)作为污染源,研究其对小新月菱形藻的急性毒性效应.通过 GC-MS 测定小新月菱形藻体内氨基酸相对含量的变化,讨论 180 #燃料油 WAF 对微藻体内氨基酸变化的毒性效应,进而初步探索其毒性对细胞内氨基酸变化的作用机理.以为原油对浮游生物所带来的危害提供一种新的研究途径.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 材料

实验使用的小新月菱形藻由国家海洋环境检测中心提供,培养在加入 Conway 营养液和维生素的灭菌海水中(海水取自大连黑石礁海域,pH=8,盐度为 35‰).在光周期为 12 L:12 D,光照强度 3000 lx,温度(20 ± 1)℃,每日随机调换锥形瓶并摇动 4 次取稳定期微藻作为实验材料,微藻密度约为 2×10⁵ mL⁻¹

1.2 实验方法

180 #燃料油分散液(WAF)制备:180# 燃料油:海水=1:9,磁力搅拌 24 h 后,静置 4 h,采用虹吸法收集下层液体,4℃保存.设置对照组和 5 组浓度梯度,分别为 1%(0.03 mg·L⁻¹),3%(0.09 mg·L⁻¹),5%(0.164 mg·L⁻¹),7%(0.230 mg·L⁻¹),10%(0.295 mg·L⁻¹),以上每组分别设置 3 组平行.

1.3 试剂

氨基酸标准品,纯度≥98%(Sigma Aldrich),甲醇(HPLC,Tedia),二氯甲烷(HPLC,国药集团化学试剂有限公司),乙酸乙酯(HPLC,Tedia),异丙醇(HPLC,Tedia),吡啶(aladdin),亚硫酰氯(aladdin),新戊酰氯(aladdin).

1.4 氨基酸提取

实验中每 24 h 用灼烧后的 Whatman GF/F 纤维滤膜抽滤小新月菱形藻藻液,放置 60℃的烘箱中,烘干 48 h,用干净的刀片使藻体和滤膜分离,收集藻体备用.

准确称取氨基酸标准品或上述藻体样品 40 mg 置于 pyrex 试管中,加入 2 mL 6 mol·L⁻¹的盐酸.向试管中冲 N₂气 1 min,完全置换出其中的空气后密封,110℃水解 24 h.

本实验运用 GC-MS(Thermo Fisher Scientific)法分析氨基酸,将氨基酸衍生化成相对应的 N-新戊酰基,O-异丙醇酯(NPP).具体方法如下:向氨基酸标准品或提取出来的的样品加入 2 mL 溶于异丙醇的 1 mol·L⁻¹的氯化亚砷 100℃酯化 1 h,放置室温后 60℃温和氮气吹干,冷却后吡啶溶解,再加入新戊酰氯 60℃酰化 30 min,反应完全后待液体冷却,向其中加入 2 mL 二氯甲烷,加入到 6 cm 硅胶层析柱(内

径4 mm,200—400 目)除去杂质和多余的酰化剂,收集到的液体在室温下用温和的 N_2 吹干即为纯化的衍生物,200 mL 乙酸乙酯定容待测。

1.5 GC-MS 分析

将 1.4 节中得到的 1 mL 氨基酸样品以不分流模式注入.使用 He(99.999%纯度)作为载气(恒定流速模式下 $1.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)的 DB-5MS 毛细管柱(60 m \times 0.25 mm \times 0.25 mm)用于分离 AA.注入器温度为 280 $^{\circ}\text{C}$.以电子电离(EI)模式进行分析,并且在 70 eV 的电子能量下收集 MS 谱。

通过对标准品的测定可得到 16 种氨基酸的保留时间,以这些保留时间作为标准可判断样品各个氨基酸衍生物出峰的具体时间.根据其峰面积占总数的比例,可以得到各个氨基酸的相对含量。

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 WAF 对小新月菱形藻生长的影响

小新月菱形藻暴露在不同浓度下微藻生长密度变化趋势从总体看来(图 1),各处理组细胞密度呈指数增长,微藻细胞的抑制率随 WAF 浓度的升高而增大,96 h 条件下对小新月菱形藻的抑制率分别为 5.73%、12.85%、14.78%、18.65%、34.90%。WAF 低浓度(1%和 3%)组具有明显促进藻细胞生长的趋势,WAF 高浓度(5%、7%、10%)对藻细胞具有抑制作用.Morales-Loo 和 Goutz^[10]认为水生环境中的石油碳氢化合物可能对藻类生长产生一定影响,抑制一些敏感物种的生长并促进耐受性物种的生长.WAF 高浓度(5%、7%、10%)处理条件下的微藻平均生长量仅为 WAF 低浓度(1%和 3%)处理条件下微藻平均生长量的 85.06%。刘瑀等^[11]探究轻质阿拉伯原油分散液对小新月菱形藻细胞密度的影响,在 WAF ($\leq 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)低浓度作用下,对小新月菱形藻有促进生长的作用,而较高浓度($\geq 5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)则使藻细胞生长受到抑制,与本实验结果相似。

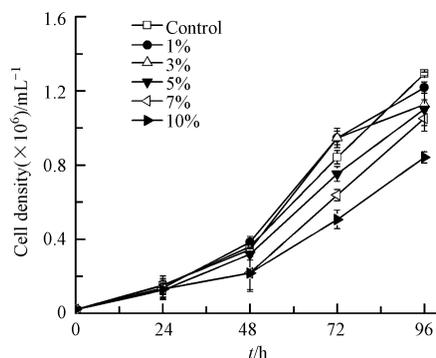


图 1 不同时间各 WAF 浓度下小新月菱形藻细胞密度

Fig.1 Cell density of *N. closterium* in each of WAF concentrations at different times

2.2 小新月菱形藻氨基酸相对含量分析

在 96 h 急性毒性实验下,通过使用 GC-MS 在小新月菱形藻中共检测出 16 种氨基酸(图 2),分别是丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thre)、丝氨酸(Ser)、蛋氨酸(Met)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、半胱氨酸(Cys)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、酪氨酸(Tyr)。其中丙氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、组氨酸等 7 种氨基酸的相对含量比较高,可作为主要氨基酸分析.王大志等^[12]探究了 7 种微藻类中各种氨基酸的组成,均为天冬氨酸、谷氨酸和亮氨酸含量较高,半胱氨酸、甲硫氨酸、组氨酸和脯氨酸的含量较低.王爱英等^[13]探究了 3 种微藻和 2 种大型海藻的氨基酸组成,其中 3 种微藻均以亮氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸为主,2 种大型海藻以缬氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸为主.由于微藻和大型海藻氨基酸构成具有一定差别,且不同微藻种类的微藻氨基酸组成也有差别,此外在分析和培养方法上也不尽相同,所以测得的氨基酸种类也有差异。

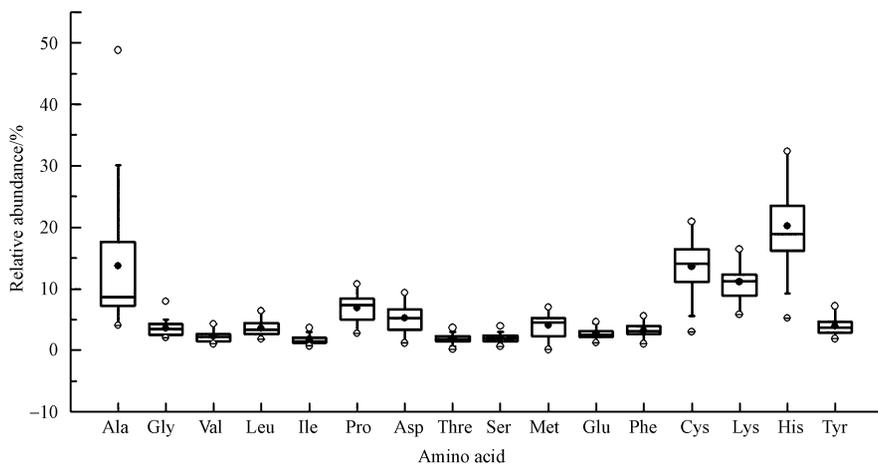


图2 96 h 急性毒性实验下小新月菱形藻氨基酸组成箱型图 (Box-plot)

(上下直线为最大值和最小值,方框为第25%到75%数值范围,方框内的直线为中位数,空心点为异常值,实心点为平均值)

Fig.2 Composition of amino acids in *N. closterium* acute toxicity experiment with boxes plots at 96 h

(The upper and lower whiskers indicate maximum and minimum values, the boxes show the 25% and 75% percentile range, and the line inside the boxes shows the median. The empty dots show outlier values, and the solid dots average values)

从表1和图3可知,随着培养时间延长,对照组的丙氨酸相对含量由11.01%增加至48.80%,与培养时间有良好的线性关系($R^2=0.9526$).WAF低浓度组(1%和3%)丙氨酸相对含量也有明显增加,与培养时间有良好的线性关系($R^2=0.9969$ 和 $R^2=0.8751$).但是WAF高浓度组(7%和10%),丙氨酸相对含量低于对照组和WAF低浓度组的相对含量.且在加入WAF组分中,丙氨酸的相对含量全部低于对照度,且随培养时间延长,含量差距越明显.由图4可知,在对照组和WAF低浓度组(1%和3%),半胱氨酸相对含量随培养时间增加而减小,而WAF高浓度组(5%、7%和10%),则与低浓度趋势相反.因丙氨酸合成路径可通过丙酮酸直接合成,也可通过半胱氨酸合成^[14].对照组中丙氨酸和半胱氨酸的相对含量变化趋势相反,丙氨酸的合成更倾向于半胱氨酸的合成路径,在WAF低浓度条件下,其规律也与对照组相似.而在WAF高浓度下,半胱氨酸相对含量增大,丙氨酸的相对含量变化趋势不明显,此时丙氨酸可能多由丙酮酸路径直接转化合成,由此可知,不同WAF浓度刺激微藻可影响微藻细胞内氨基酸合成路径的选择.由图5可知,脯氨酸对照组和各浓度WAF组脯氨酸相对含量随培养时间增加而增大($R^2 \geq 0.8112$).

表1 4种氨基酸标准曲线方程和相关系数

Table 1 Regression equation and correlation coefficient of 4 amino acids

分散液 WAF	丙氨酸 Ala		脯氨酸 Pro	
	线性方程 Regression equation	相关系数 R^2	线性方程 Regression equation	相关系数 R^2
Ctrl	$y=0.4907x-0.5337$	$R^2=0.9526$	$y=0.0673x+0.9963$	$R^2=0.9320$
1%	$y=0.258x+0.2218$	$R^2=0.9969$	$y=0.0911x+0.4953$	$R^2=0.9217$
3%	$y=0.1669x+5.8956$	$R^2=0.8751$	$y=0.1019x-0.3106$	$R^2=0.9581$
5%	$y=0.0827x+2.6101$	$R^2=0.9502$	$y=0.0526x+0.7647$	$R^2=0.9984$
7%	$y=0.0134x+7.5184$	$R^2=0.2147$	$y=0.047x+4.5645$	$R^2=0.8907$
10%	$y=-0.0042x+6.2494$	$R^2=0.0112$	$y=0.039x+4.7216$	$R^2=0.8112$
分散液 WAF	天冬氨酸 Asp		半胱氨酸 Cys	
	线性方程 Regression equation	相关系数 R^2	线性方程 Regression equation	相关系数 R^2
Ctrl	$y=-0.0742x+8.0553$	$R^2=0.9621$	$y=-0.1722x+21.133$	$R^2=0.9036$
1%	$y=-0.0342x+7.0060$	$R^2=0.8363$	$y=-0.1421x+18.467$	$R^2=0.8645$
3%	$y=-0.067x+9.14970$	$R^2=0.9614$	$y=-0.1601x+23.329$	$R^2=0.9936$
5%	$y=-0.0796x+11.229$	$R^2=0.7687$	$y=0.0783x+12.128$	$R^2=0.7740$
7%	$y=-0.0436x+8.6833$	$R^2=0.8925$	$y=0.0825x+11.303$	$R^2=0.9031$
10%	$y=-0.0775x+9.9677$	$R^2=0.9185$	$y=0.0645x+9.984$	$R^2=0.9542$

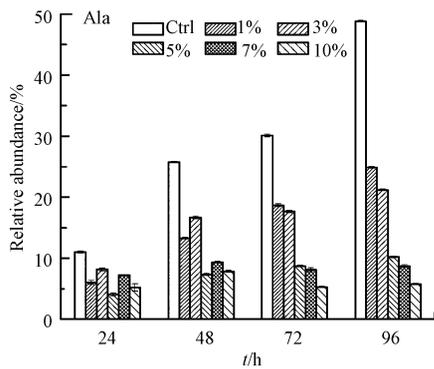


图 3 不同时间各 WAF 浓度下丙氨酸相对含量

Fig.3 Relative abundance of Ala in each of WAF concentrations at different time

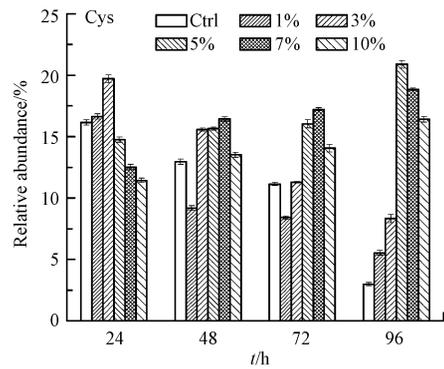


图 4 不同时间各 WAF 浓度下半胱氨酸相对含量

Fig.4 Relative abundance of Cys in each of WAF concentrations at different time

由表 1 和图 6 可知,除 5% WAF 组分从 24 h 到 48 h 天冬氨酸相对含量由 8.10% 升高到 9.33%, 随后在 72 h 降到 5.31%。对照组和其他 WAF 浓度下,天冬氨酸相对含量随培养时间增加而降低 ($R^2 \geq 0.8363$)。随培养时间增加蛋氨酸和赖氨酸相对含量无明显变化规律(图 7、8)。蛋氨酸和赖氨酸在细胞内部生物合成过程在同一通路下进行,丙酮酸进入线粒体中氧化脱氢生成乙酰 Co-A 经过 TCA 循环生成草酰乙酸,进而合成天冬氨酸,当天冬氨酸转化为天冬氨酸盐合成蛋氨酸和赖氨酸^[15-16]。天冬氨酸在细胞合成中,给多种氨基酸提供反应前体,含量可能随培养时间增加而降低,赖氨酸相对含量可能因其反应路径复杂并且有其他氨基酸参与反应而与培养时间无明显变化规律。

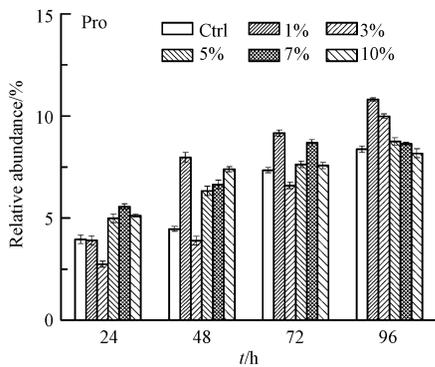


图 5 不同时间各 WAF 浓度下脯氨酸相对含量

Fig.5 Relative abundance of Pro in each of WAF concentrations at different time

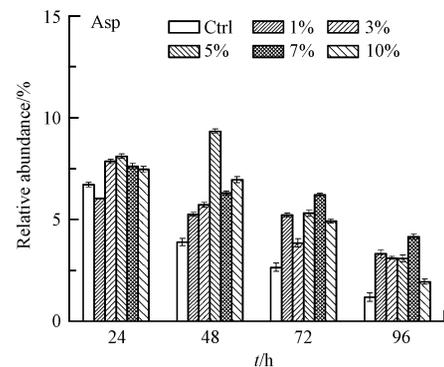


图 6 不同时间各 WAF 浓度下天冬氨酸相对含量

Fig.6 Relative abundance of Asp in each of WAF concentrations at different time

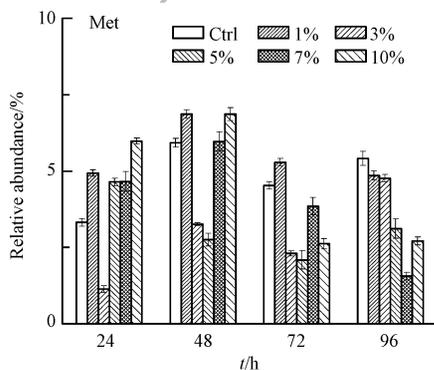


图 7 不同时间各 WAF 浓度下蛋氨酸相对含量

Fig.7 Relative abundance of Met in each of WAF concentrations at different time

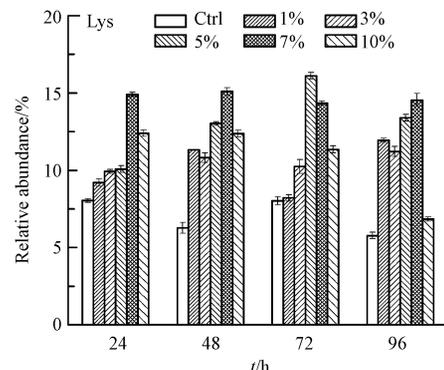


图 8 不同时间各 WAF 浓度下赖氨酸相对含量

Fig.8 Relative abundance of Lys in each of WAF concentrations at different time

由图 9 可知,在对照组和 WAF 低浓度组(1%和 3%),组氨酸的相对含量随时间延长而降低.而高浓度 WAF(5%、7%和 10%)下,组氨酸的相对含量随着培养时间增加呈先降低后升高的趋势.由于组氨酸合成路径特殊,在细胞质中由葡萄糖直接氧化分解生成 5-磷酸核糖,由 5-磷酸核糖直接合成组氨酸^[17].由于组氨酸反应路径单一,且没有其他氨基酸参与反应,在高浓度刺激下,组氨酸相对含量变化明显,在初始培养时间下,可能导致组氨酸合成受阻,使相对含量降低,而在后期培养下,随细胞耐受性增大,因而组氨酸合成恢复,使相对含量升高.

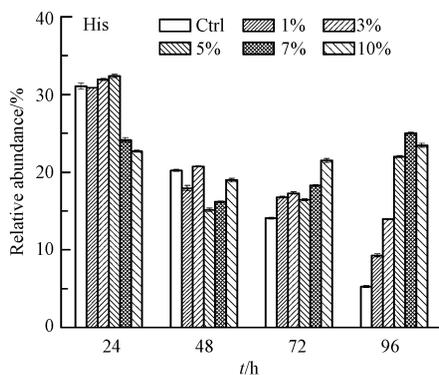


图 9 不同时间各 WAF 浓度下组氨酸相对含量

Fig.9 Relative abundance of His in each of WAF concentrations at different time

3 结论 (Conclusion)

在不同浓度 180 #燃料油 WAF 胁迫下,探究小新月菱形藻急性毒性实验.分析发现在溢油刺激下小新月菱形藻生长有“低促高抑”的规律.随培养时间增加,在对照组和低浓度 WAF 组(1%和 3%)中丙氨酸相对含量与培养时间呈正相关,而在高浓度 WAF 组中丙氨酸相对含量无明显变化趋势.在各浓度梯度下,随培养时间增加脯氨酸相对含量增加,而天冬氨酸相对含量变化与脯氨酸相反.在对照组和低浓度 WAF(1%和 3%)组中,半胱氨酸的相对含量随培养时间增加而减小,而高浓度 WAF(5%、7%和 10%)组分下,则与低浓度趋势相反.对照组和低浓度 WAF(1%和 3%)组分下,组氨酸相对含量随时间增加而降低.而高浓度 WAF 组(5%、7%和 10%),随培养时间增加呈先降低后升高的趋势.可得结论,在溢油刺激下可导致小新月菱形藻各氨基酸含量呈现不同变化规律,此规律产生的原因可能是由于微藻受溢油刺激体内氨基酸合成路径选择不同.该结论可为石油污染生态监测提供新的基础数据,同时可为进一步探究溢油对微藻的毒性作用机理奠定理论基础.

参考文献 (References)

- [1] PI Y, XU N, BAO M, et al. Bioremediation of the oil spill polluted marine intertidal zone and its toxicity effect on microalgae [J]. Environ Sci Process Impacts, 2015, 17(4): 877-885.
- [2] 高祥, 石晓勇, 韩秀荣, 等. 石油烃类污染物对中肋骨条藻和微型原甲藻的毒性效应研究 [J]. 海洋环境科学, 2017, 36(6): 918-923.
GAO X, SHI X Y, HAN R X, et al. Toxicity of petroleum hydrocarbon pollutants on *Skeletonema Costatum* and *Prorocentrum Minimum* [J]. Marine Environmental Science, 2017, 36(6):918-923 (in Chinese).
- [3] 袁萍, 吕振波, 周革非. 石油烃胁迫下 3 种微藻的生长动力学研究 [J]. 海洋科学, 2014, 38(10):46-51.
YUAN P, LÜ Z B, ZHOU G F. Growth kinetics of 3 species of microalgae treated with petroleum hydrocarbon [J]. Marine Sciences, 2014, 38(10):46-51 (in Chinese).
- [4] 马帅, 曲良, 李晓红, 等. 四种溢油分散剂对青岛大扁藻和小新月菱形藻细胞密度和叶绿素含量的影响 [J]. 生态科学, 2015, 34(6):9-15.
MA S, QU L, LI X H, et al. Effects of four dispersants on cell density and chlorophyll contents of *Platymonas helgolandica* var. *tsingtaoensis* and *Nitzschia closterium* f. *minutissima* [J]. Ecological Science, 2015, 34(6):9-15 (in Chinese).
- [5] 陈刚, 肖慧, 唐学玺. 3 种海洋赤潮微藻蛋白质和核酸合成动态对砒胁迫的响应 [J]. 海洋环境科学, 2008, 27(4):320-322.
CHEN G, XIAO H, TANG Y X. Responses of three species of marine red-tide microalgae to pyrene Stress in protein and nucleic acid

- synthesis [J]. *Marine Environmental Science*, 2008, 27(4):320-322 (in Chinese).
- [6] 肖凯丽, 张琳, 邓百川, 等. 氨基酸对哺乳动物脂质代谢的调控及其作用机理 [J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(12): 3473-3481.
XIAO K L, ZHANG L, DENG B C, et al. Regulation effects and mechanism of amino acids on lipid metabolism in mammals [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2017, 44(12): 3473-3481 (in Chinese).
- [7] 曹淑莉, 向葆卿. 8 种海洋饵料微藻蛋白质含量及氨基酸组成比例的比较研究 [J]. *海洋学报(中文版)*, 1993, 15(4): 98-103.
Cao S L, Xiang B Q. Comparative study on protein content and amino acid composition ratio of microalgae in eight marine foods [J]. *Haiyang Xuebao*, 1993, 15(4): 98-103(in Chinese).
- [8] AKSMANN A, TUKAJ Z. Intact anthracene inhibits photosynthesis in algal cells: A fluorescence induction study on *Chlamydomonas reinhardtii* cw92 strain [J]. *Chemosphere*, 2008, 74(1):26-32.
- [9] FAKSNESS L G, BRANDVIK P J, SYDNES L K. Composition of the water accommodated fractions as a function of exposure times and temperatures [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 56(10): 1746-1754.
- [10] MORALES-LOO M R, GOUTX M. Effects of water-soluble fraction of the mexican crude oil "Isthmus Cactus" on growth, cellular content of chlorophyll a, and lipid composition of planktonic microalgae [J]. *Marine Biology*, 1990, 104(3): 503-509.
- [11] 刘瑀, 李颖, 王晓琦, 等. 原油分散液对小新月菱形藻 C、N 稳定同位素组成的影响 [J]. *海洋环境科学*, 2015, 34(4): 503-507.
LIU Y, LI Y, WANG X Q, et al. Effect of crude oil dispersion on carbon and nitrogen stable isotopic composition of nitzschia closterium [J]. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(4): 503-507 (in Chinese).
- [12] 王大志, 朱友芳, 李少菁, 等. 七种微藻蛋白质含量和氨基酸组成的比较 [J]. *台湾海峡*, 1999, 18(3): 297-302.
WANG D Z, ZHU Y F, LI S Q, et al. Studies on protein content and amino acid composition of seven microalgae [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1999, 18(3): 297-302 (in Chinese).
- [13] 王爱英, 许鹏, 崔喜艳. 微拟球藻蛋白质含量和氨基酸组成分析 [J]. *山东师范大学学报(自然科学版)*, 2014, 29(1): 137-140.
WANG A Y, XU P, CUI X Y. Analysis of protein and amino acid composition of *Nannochloropsis Oculata* [J]. *Journal of Shandong Normal University (Natural Science)*, 2014, 29(1): 137-140 (in Chinese).
- [14] BROMKE M A. Amino acid biosynthesis pathways in diatoms [J]. *Metabolites*, 2013, 3(2): 294-311.
- [15] WULANDARI A P, MIYAZAKI J, KOBASHI N, et al. Characterization of bacterial homocitrate synthase involved in lysine biosynthesis [J]. *Febs Letters*, 2002, 522(1-3): 35-40.
- [16] JOSHI V, JOUNG J G, FEI Z, et al. Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: Accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress [J]. *Amino Acids*, 2010, 39(4): 933-947.
- [17] STEPANSKY A, LEUSTEK T. Histidine biosynthesis in plants [J]. *Amino Acids*, 2006, 30(2): 127-142.