

铁对中肋骨条藻生长、色素化程度及氮同化能力的影响

陈慈美 郑爱榕 周慈由 陈宇舟

(厦门大学海洋学系)

摘 要 以中肋骨条藻为对象,研究了铁以及铁与氮的交互作用对藻类生长、色素化程度及氮同化能力的影响.结果表明,在 $3 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-6} \text{mol/dm}^3$ 浓度范围内,随着Fe的增加,该藻对氮的吸收量增加,同化能力增大,细胞色素化程度降低,胞内氨基酸(AA)和蛋白质(Pr)含量升高,细胞生长加快,细胞生长率在Fe浓度为 $5 \times 10^{-6} \text{mol/dm}^3$ 时达最大.叶绿素a和褐色素以及胞内AA和Pr与铁浓度的对数呈正相关关系.实验还发现,当N/P为20:1时(比较40:1和10:1),铁与氮交互作用对细胞生长、色素化程度以及氮同化能力影响尤其显著;当Fe浓度一定时,不同形态的氮源对藻胞内AA转化为Pr速率的影响是低氧化态氮源高于高氧化态氮源.

关键词 中肋骨条藻 铁 生化组成 氮同化能力 色素化

前 言

海洋中痕量金属元素对生物生态尤其对富含N和P的表层水海域的初级生产力有着重要的作用^[1].铁是多种藻类代谢过程生物能的一个重要的起决定作用的生化元素^[2].叶绿素的生物合成、藻对介质C和N的转移和同化作用以及胞内生化组成比率的变化都受铁的影响^[3].

本文就铁对藻类生长、色素化程度及氮同化能力的影响,选择中肋骨条藻进行一次性培养,测定了不同变量(Fe浓度、N/P比值和不同形态的氮源)条件细胞的叶绿素a、褐色素、胞内外碳水化合物、氨基酸和蛋白质等生化组成,旨在从微观分子水平探讨与藻生长繁殖密切相关的胞内活性碳、氮组分和色素如何受营养物形态和水平(尤其是Fe)的制约而造成增殖状况差异,以进一步了解铁的生化作用.此外,中肋骨条藻是中国沿海海域一种数量众多且最常见的藻类,有人认为中国沿海海域的赤潮多次由其形成或参与^[1].因此,希望本文能为中国沿海海域初级生产力的提高和赤潮的控制提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 藻种和培养

中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 培养: 取陈化半年的厦门沿岸海水, 经 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 高压消毒后 ($\text{pH}=7.9$, $\text{Cl}\times 10^{-3}=13\pm 1$), 加入培养基 (不加铁的 $\frac{f}{z}$ 配方), 在 1560lx 、 $L:D=12:12$ 及 24°C 的条件下进行纯种培养。

1.2 实验方法

在消毒海水中 ($\text{Cl}\times 10^{-3}$ 为 13 ± 1) 分别加入所需浓度的 N、P 和 Fe, 控制适当温度 (24°C) 和光强 (1560lx 、 $L:D=12:12$), 用硼砂硼酸缓冲液调 $\text{pH}=7.9$, 接入藻种使其密度为 $10^3\text{cells}/\text{cm}^3$, 逐日测定细胞数, 5d 后分离, 滤液用于测定细胞外氨基酸 (AA), 溶解碳水化合物以及氮和铁的残留量。滤膜则用三氯醋酸匀浆萃取后分离, 上滤液用于测定胞内氨基酸 (PAA) 和胞内碳水化合物 (PCH_2O), 不溶物用 $0.1\text{mol}/\text{dm}^3$ NaOH 溶解, 供蛋白质 (Pr) 测定。

1.3 藻的生长和生化组成的测定

细胞数用 ZB 型 Coulter 计数器计数^[5]。叶绿素 a 和褐色素用丙酮萃取荧光分析法测定^[5]。 PCH_2O 、Pr 和 AA 分别用蒽酮^[6]、Folin-酚^[6]、邻苯二甲醛法^[5]测定。藻细胞活体荧光强度在 GFY-160 型荧光分光计, 入为 650, 直接测定。胞外溶解碳水化合物 (DCH_2O) 用苯酚硫酸试剂分光光度法测定^[7]。

2 结果和讨论

2.1 铁对中肋骨条藻生长及色素化程度的影响

2.1.1 铁对中肋骨条藻生长、光合色素和光合产物的影响

研究^[1]表明藻类在光合作用过程中是以结合表面配位体而后传输过细胞膜的方式吸收环境中的铁离子。图1是不同浓度下藻的相对生长曲线。由图可知不同浓度的铁对中肋骨条藻的生长有较大的影响。铁浓度在 $3.2\times 10^{-8}\sim 5\times 10^{-6}\text{mol}/\text{dm}^3$ 范围内, 随铁浓度增大藻相对生长率 (N_t/N_0) 也随之增大, 且比未添加铁的铁藻生长率均增加两倍以上, 在 $5\times 10^{-6}\text{mol}/\text{dm}^3\text{Fe}$ 时达最大, 大于此值时又有所下降。图2也体现这一规律。若用细胞净生长速率 μ 来表示 Fe 对细胞生长的影响 ($\mu = \frac{1}{t} \ln \frac{N_t}{N_0}$), 则根据 Monor 方程^[4]:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_{\text{Fe}}}{K_{\mu} + C_{\text{Fe}}}$$

变换得到:

经线性回归分析得一直线方程:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{88.9}{C} + 2.22$$

解得 $\mu_{\max} = 1.46 \text{d}^{-1}$; $K_{\mu} = 130 \mu\text{g}/\text{dm}^3$; $C_{\max} = 260 \mu\text{g}/\text{dm}^3 = 4.64 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. 即 Fe 浓度为 $4.64 \times 10^{-6} \text{mol}/\text{dm}^3$ 时细胞的净生长速率最大. 两者结果颇为吻合.

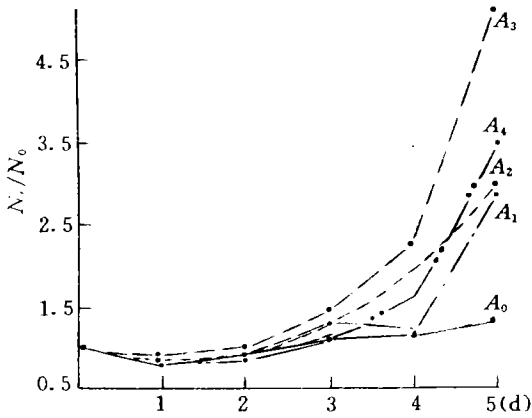


图1 不同铁浓度下藻的相对生长曲线

Fe 浓度为 $32 \times 10^{-8} \text{mol}/\text{dm}^3$;

A_0 未添加 Fe

A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 分别添加 Fe 为 1×10^{-7} 、

5×10^{-7} 、 5×10^{-6} 和 $1 \times 10^{-5} \text{mol}/\text{dm}^3$

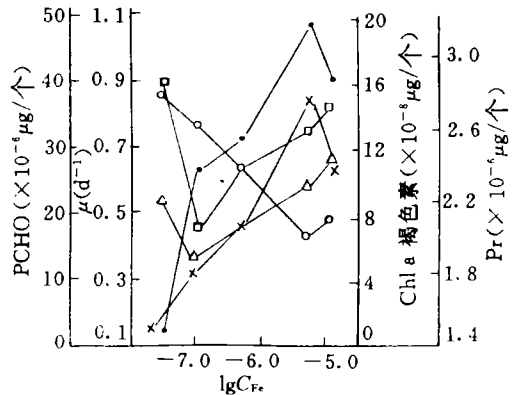


图2 Fe 浓度与 μ 、 $\text{PCHO}/\text{个}$ 、 $\text{Chl a}/\text{个}$ 、
褐色素/个和 $\text{Pr}/\text{个}$ 的关系

\bullet — μ (d⁻¹) \circ — $\text{PCHO}/\text{个}$ \square — $\text{Chl a}/\text{个}$

\triangle —褐色素/个 \times — $\text{Pr}/\text{个}$

如图2, Fe 浓度在 $5.0 \times 10^{-6} \text{mol}/\text{dm}^3$ 时 μ 值达最大, 同时单位体积细胞中叶绿素和褐色素以及蛋白质 (Pr) 含量均达最大, 单位体积细胞内碳水化合物 (PCHO) 为最小, 我们认为该浓度是 Fe 对藻生长起促进作用的临界值. 曾有报道 Fe 浓度超过 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ 数量级就具有毒性^[8]. 我们认为可能是浓度大于 $10^{-5} \text{mol}/\text{dm}^3$ 时 Fe 离子主要以胶体形态存在于溶液中, 过多包裹在细胞表面, 影响了细胞对营养物质吸收和细胞分裂.

叶绿素 a 可以表示海洋浮游植物自然种群的生物量, 它以色素-蛋白质复合体的形式存在, 是进行光合作用重要物质. 对于细胞色素、铁氧化还原蛋白和铁硫基蛋白, 铁是不可缺乏的元素^[9]. 铁的贫乏将导致 Chl a 生物合成降低、光合作用减弱、光合产物及胞内活性组分 (PAA、Pr、PCHO、RNA 和 DNA 等) 减少, 细胞分裂速率降低. 图2结果表明细胞健康生长所需环境 Fe 浓度为 $3 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-6} \text{mol}/\text{dm}^3$.

细胞通过光合作用, 将吸收的无机营养盐转化为 AA 和 CH_2O , 这些光合作用产物可进一步合成较高级的有机物—Pr, 多糖、脂类、RNA 和 DNA 等, 因此随 Fe 浓度的增加, $\text{PCHO}/\text{个}$ 减少, 而 $\text{Pr}/\text{个}$ 增加.

2.1.2 铁对中肋骨藻色素化程度和荧光特性的影响

比值 $\text{Pr}/\text{Chl a}$ 可以表示细胞色素化的程度. 在一定条件下, Pr 与 Chl a 保持一定比例.

Pr/Chl a 升高表示细胞色素化程度降低和 Pr 转化能力的增强. 图3表明了 Fe 浓度对藻细胞色素化程度的影响. 显然, 在 $3 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$ 之间, 随 Fe 浓度的增加, Pr/Chl a 亦增大, 色素化程度降低, 说明 Fe 不仅增强了藻对硝酸氮的转移速率和同化作用, 而且提高了 Chl a 的含量和光合活性, 最终提高了 Pr 的合成率. 然而当 Fe 浓度达到 $5 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ 时, Chl a 亦达最大, 它的增加大大超过 Pr 的增加, 使得 Pr/Chl a 明显下降. 在氮限制 (N:P=10:1) 时, 这种影响较为突出. 关于不同 N/P 比值的影响将在 2.2.2 讨论.

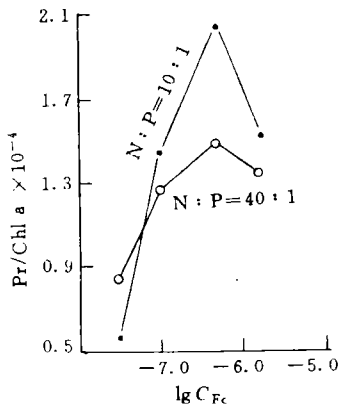


图3 不同 N/P 比值下 Fe 浓度对 Pr/Chl a 的影响

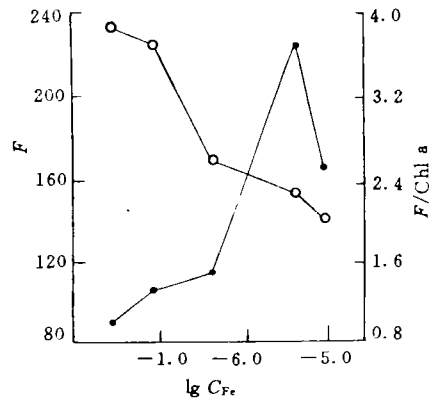


图4 Fe 浓度与活体细胞荧光强度和细胞光合效率的关系
— F — F/Chl a

藻类吸收的光能在光合作用中未被利用的部分大都以荧光、热辐射等形式散发出来, 光合作用效率愈低则荧光发射愈强^[10]. 细胞光合效率可用 $F/\text{Chl a}$ 表示, 其中 F 为活体细胞荧光强度. 由图4可见, 随着 Fe 浓度的增加, 不仅 Chl a 生物合成增加, 而且细胞光合效率也提高, 胞内光能贮存也增大, 因而 F 值增加. 但 Chl a 的增加更快, 故使 $F/\text{Chl a}$ 呈下降趋势, 说明胞内 Fe 和 Chl a 的富足不仅吸收更多的能量, 合成更多的 PCHO, 而且能将部分未利用的能量贮存起来, 提高细胞的生物活性.

2.2 铁对中肋骨条藻氮同化能力及生长的效应

2.2.1 相同 N/P 比值下, 铁浓度的影响

藻类吸收环境中的氮, 将它转化为氨基酸, 部分贮存, 部分继续转化合成 Pr 和核酸. 在其生长过程中还会释放一部分 AA 到介质中. 如图5. 在 N:P=20:1 条件下, 随 Fe 浓度升高 (在 $3.6 \times 10^{-8} \sim 5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ 浓度范围内), 藻体对氮的吸收增大 (即残留的 NO_3^- 减少), 胞外 AA 减少, 而胞内 AA 增大, 单位细胞内合成的 Pr 亦随之增大, 两者互为镜像关系. 这说明铁有利于细胞对氮的吸收转化和 PAA 的提高, 而且对 Pr 的合成有促进作用.

2.2.2 不同氮、磷比值下铁浓度的影响

图6显示了3种 N/P (DRP 均为 $40 \mu\text{g/dm}^3$) 下 Fe 对细胞生长的影响. 显然, 不论在何 N/P 比值, Fe 浓度为 $5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ 时对藻的生长均有促进作用, 但是氮限制比磷限制对藻生长速率 (μ) 影响更显著. 当 N/P 为 20:1 时细胞生长最好. 这可能与胞内 N/P 比值和

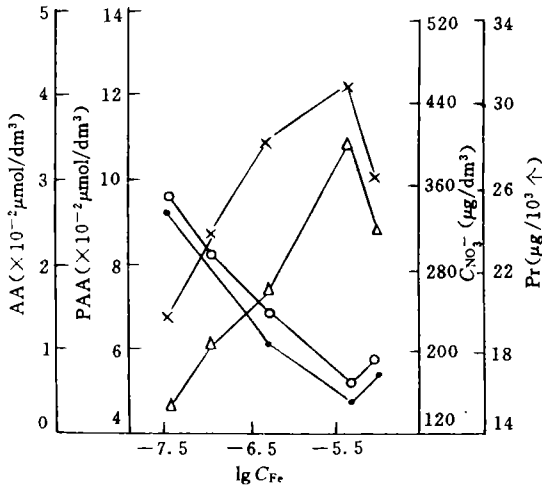


图5 以硝酸氮为氮源时 Fe 浓度对氮同化能力的影响
 ●—AA ×—PAA △—Pr/个
 --- 溶液中残留的 C_{NO₃⁻}

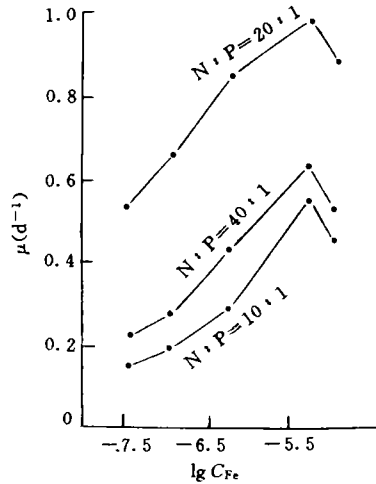


图6 以 NO₃⁻-N 为氮源不同 N/P 比值下铁对藻生长的影响

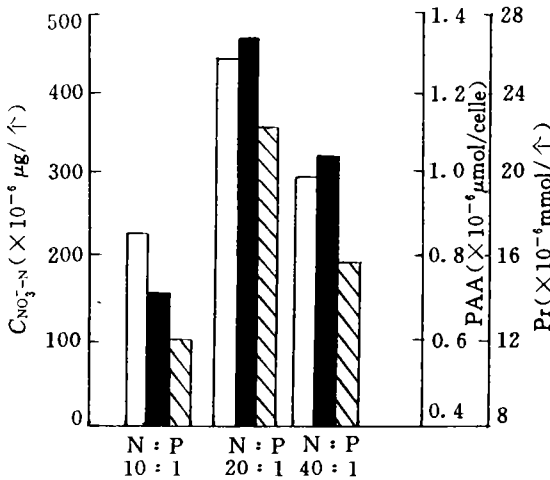


图7 Fe 浓度为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ 和不同 N/P 比值下藻吸收的 NO₃⁻-N 和 PAA、Pr 的含量
 □—藻吸收的 NO₃⁻-N ■—Pr/个
 ▨—PAA/个

长期对环境条件适应性有关. 图7更清楚地表明了这一规律, 很明显藻对氮吸收以及胞内 Pr 和 AA 含量在 N/P 为 20:1 时最高, 相反在 10:1 时最低.

2.2.3 不同形态的氮源与铁的交互作用的影响

理论上铵氮能直接转化为细胞活性有机物, 而硝酸氮需经过铁还原蛋白还原后才能被利用. 因此各种形态氮中铵氮最易被细胞吸收. 由表1, 藻细胞吸收不同形态氮源, 其生化组成的差异, 进一步证实了铵氮优于硝酸氮. 此外, 还可看出中肋骨条藻以有机氮为唯一氮源时仍能很好地生长, 说明该藻除了主动吸收无机氮外, 还能吸收有机氮营养生长, 与无机氮相比, 胞内 PAA 含量较

低, PCH₂O 值较高, Pr 含量也较高. 细胞在异养生长时, 对有机氮的吸收转化途径将与对无机氮的同化不同, 若是以氨基酸作为氮源, 则无需经过胞内酶转化成 AA 过程, 可直接利用. 而以尿素作氮源将在尿素酶催化下, 分解成氨和 CO₂, 进一步被利用 (Leftley and Syrett), 就不同形态的氮源而言, 吸收低氧化态氮源比高氧化态氮源, 其胞内 PAA、转化为 Pr 的速率较快, 相应地 Pr 含量也较高 (表1第6纵行).

上述实验结果表明藻类胞内各种含氮组成的环境依赖性及其转换规律可用图8概括.

表1 藻细胞吸收不同形态的氮源之生化组成变化

氮源	μ (a^{-1})	Chla	褐色素	PCHO	Pr	AA	PAA
		($\mu g/dm^3$)				($\mu mol/dm^3$)	
硝酸氮	1.08	0.023 1	0.089 0	66.67	284	0.004 8	0.121 0
铵氮	0.90	0.056 4	0.037 9	85.33	349	0.033 2	0.144 6
氨基酸	0.98	0.073 5	0.068 8	118.67	889	0.066 4	0.062 6
尿素氮	1.08	0.089 6	0.084 8	136.32	1 065	0.043 2	0.040 3

注: Fe 为 $10^{-6} mol/dm^3$; N/P=20:1; 细胞数为 10^6 个/ dm^3 。

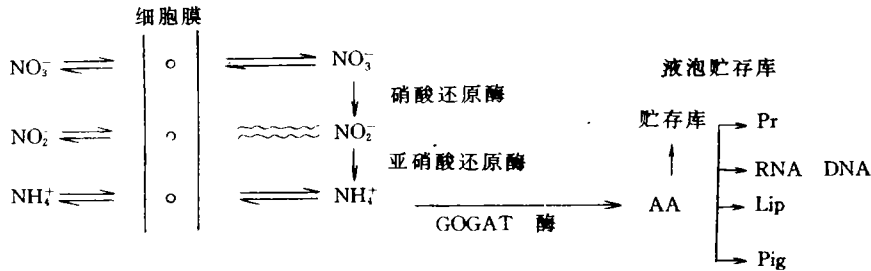


图8 不同形态氮在藻细胞内生长、生命过程中简单的生化行为

一般认为藻类吸收 NO_3^- -N 由主动运输系统完成, 被位于质膜上的 ATP 酶所催化. 一旦 NO_3^- -N 进入贮库, 可贮存于液泡或经硝酸、亚硝酸还原酶还原为 NH_4^+ , 藻对 NH_4^+ -N 的吸收也以主动运输为主^[11], NH_4^+ -N 通过谷氨酸合成酶的调节^[12]. 形成的 AA 用于生物生长所需的 Pr、核糖、核酸和色素等生物大分子的合成. 未被利用的少部分 NH_4^+ -N, NO_3^- -N、AA 和光合作用产物 $PCHO$ 则形成暂时性贮库. 当环境氮供应不足时, 藻类会自动将贮存的氮转换为生长必需的含氮组成以供藻分裂生长需要, 对环境氮源的波动起缓冲调节作用. 因此研究藻对含量及形态不同的氮的吸收、转换及其生长关系具有重要的生理生态学意义. 铁作为硝酸盐还原酶体系的共因子参与硝酸盐还原, 也引起亚硝酸盐的还原, 铁的贫乏可以降低 NO_3^- -N 的还原水平^[3]. 此外, 它在碳氮的同化作用中又起着催化和能量流动反应的双重作用, 可以改变光合作用分布状态, 从而改变胞内生化组成的比率, 引起细胞分裂和生长的差异.

参考文献

- Hudson k J M. Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnol. Oceanogr.*, 1991, **36** (8): 1 742~1 755
- John G R *et al.* The role of iron nutrition in photosynthesis and nitrogen assimilation in *Scenedesmus guericulcauda* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, 1987, **23**, 452~457
- Cardenas J R *et al.* Effect of iron supply on the activities of the nitrate reducing system from chlorella. *Bioenergetics and Metabolism of Green Algae* (J Cardenas ed.). I. Miss Information Crop., New York, 1974, 10~13
- 张水浸等. 赤潮及其防治对策. 北京: 海洋出版社, 1994
- T R 帕森斯等著, 陈慈美、陈于望译. 海水分析的化学和生物学方法. 厦门: 厦门大学出版社, 1990
- 蔡武城主编. 生物物质常用化学分析法. 北京: 科学出版社, 1982
- 唐思齐等. 海水中碳水化合物测定方法研究. 山东海洋学院学报, 1985, **15**(3): 48~52

- 8 John T A *et al.* Iron mediated changes in the growth of Lake Erie phytoplankton and axenic algal cultures. *J. Phycol.*, 1986, **22**, 109~117
- 9 Oquist G. Changes in pigment composition and photosynthesis induced by iron deficiency in the blue-green algal. *Ana lystis Ridulans Physiol. Plant.*, 1971, **25**, 188~191
- 10 杨小龙等. 光暗周期下一种海洋硅藻荧光特性和生化组成的研究. *海洋学报*, 1991, **13**(6): 822~830
- 11 Paul J H. Uptake of organic nitrogen. *Nitrogen in the Marine Environmental* (E J Carpenter ed.), Academic Press, New York, 1983, 275~308
- 12 Flynn J R. Nitrogen source for the growth of marine microalage: role of dissolved free amino acids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1986, **17**, 25~31
- 13 Finden O A S *et al.* Light-induced reduction of natural iron (Ⅱ), oxide and its relevance to phytoplankton. *Nature*, 1984, **309**, 783~784
- 14 Yasuo Nakamura. Kinetics of nitrogen or phosphorus limited growth and effects of growth conditions on nutrient uptake in *Chattonella antiqua*. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 1985, **41**(6): 381~387