

谷皮菱形藻的耐盐适应性

刘 梅 张宪孔

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

提 要

本文报道了在水产养殖上有较大经济价值的硅藻代表种类——谷皮菱形藻对盐度的适应性。该藻有较强的耐盐适应性,在含 $\leq 1.0 \text{ mol/L NaCl}$ 的培养基中均能生长,其最适生长盐度约为 18‰ (含 0.25 mol/L NaCl 的培养基)。在不同盐度下生长的细胞中其主要生化组分含量有不同程度的改变。类胡萝卜素/叶绿素的比值随盐度的增加略有升高,这主要是由于叶绿素含量随盐度增高而降低所致;细胞蛋白质含量与盐度改变无明显关系;但糖类却随盐度提高而成倍增加,表明糖类是谷皮菱形藻适应盐度改变的主要渗透调节物。同时,在较高盐度时,谷皮菱形藻细胞内氨基酸含量明显增加,显示一些氨基酸特别是脯氨酸在谷皮菱形藻耐盐适应过程中也起着相当的渗透调节作用。

关键词 谷皮菱形藻,耐盐适应性,渗透调节

近年来,植物的抗逆性(如抗碱性、抗干旱、抗冷热等)研究得到了广泛的重视。在藻类中,已知有几种真核藻有较强的耐盐适应性。如盐藻 (*Dunaliella*)、衣藻 (*Chlamydomonas*) 和小球藻 (*Chlorella*) 等的一些种类能在比海水盐度高若干倍的高盐环境中正常生长^[9]。一些原核藻如螺旋藻 (*Spirulina*)^[16]、隐杆藻 (*Aphanothece*)^[17] 也有很强的耐盐适应性。藻类细胞对超常盐度渗透改变之所以有相当强的适应性和忍耐力,是因为这些细胞能较迅速地合成渗透调节物,如多元醇 (Polyols) 或其衍生物、糖或多糖类和某种氨基酸^[4]等以迅速调节细胞的渗透压,适应环境盐度的变化。

硅藻是天然水体的重要原初生产者,又是虾、蟹、贝类等许多名贵水产品育苗中的主要开口饵料。特别是在沿海河口区和一些潮间带区域,形成盐度变化大而生物资源也较为丰富的特点。为了更好地开发利用这部分生物资源,提高相关产业的效益;同时为了探讨生物的抗盐适应机理,本文研究了不同浓度 NaCl 对谷皮菱形藻生理生化特性的影响,并取得了有意义的结果。

材 料 和 方 法

实验用谷皮菱形藻 (*Nitzschia palea*) 系本实验室从汉川县汈汉湖养殖场河蟹育苗

池中采集、分离和纯化所得^[1]。藻种先在 2.5l 试剂瓶中培养 4 天,然后离心收集,用灭菌蒸馏水洗两次后,悬浮于少量培养基中,用超声波处理 2min,镜检基本为单细胞,用作原种。

使用的培养基每升含 MgCl_2 :3.5g; MgSO_4 :2.5g; CaCl_2 :0.9g; KCl :0.65g; (以上药品全用海产粗盐制品)。 KH_2PO_4 :0.05g; Na_2SiO_3 :0.1g; Na_2HCO_3 :0.1g; Urea :0.05g。 NaCl 按实验设计另加,使成 0、0.25、0.50、0.75 和 1.00 mol/L NaCl 浓度系列。

实验用 5 只 2.5L 试剂瓶,每瓶装培养基 2L,接入原种,起始浓度为 $\text{O.D.}_{420} = 0.05 - 0.08$ 。在 20℃ 恒温水浴中,以 2×4 只 20W 日光灯从两侧提供光源,连续光照(表面光强 $30\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)和通空气、悬浮状态下培养。

每天定时取样测定生长速率、叶绿素和类胡萝卜素、干重、糖和蛋白质含量。生长速率的测定是每天取样测光密度值 ($\text{O.D.}_{420\text{nm}}$),用以计算细胞加倍时间^[8]。

干重、色素、糖类和蛋白质测定样品均离心,再用蒸馏水洗两次将培养基盐份洗净,然后分别分析:叶绿素分析按 Arnon, D. I. 方法^[9];糖类的测定采用酚一硫酸法^[10];蛋白质含量的分析采用福林法^[13];氨基酸组分和含量:先将样品烤至恒重,再加 16mol/L HCl 水解 24h,然后以日立 835—50 氨基酸自动分析仪分析。

结果和讨论

1. 谷皮菱形藻对盐度的生长适应

单细胞藻类对环境因子改变能否适应的直接表现是生长情况。在给定条件下,不同盐度对谷皮菱形藻的生长影响示于图 1。在培养基中 NaCl 含量 $\leq 1.00\text{mol/L}$ 的任何盐度下,谷皮菱形藻都能生长,而其最适生长盐度约为 18‰ 即含 0.25mol/L NaCl 的培养

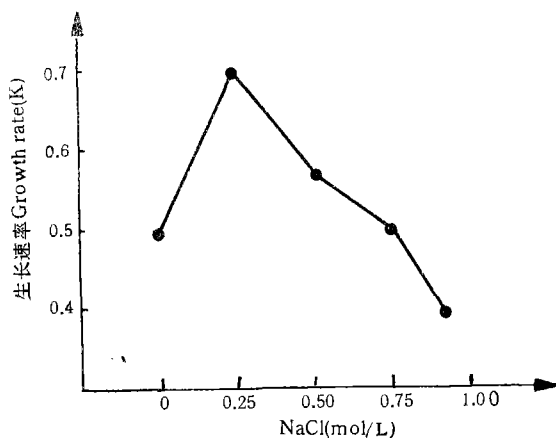


图 1 不同浓度 NaCl 对谷皮菱形藻生长速率(k)的影响
Fig.1 Effect of NaCl concentration on growth of the diatom *Nitzschia palea*

基(细胞加倍时间为 34h),就 NaCl 含量而言,这约相当于半海水。结果表明,谷皮菱形藻是一种广盐适应性藻类,与所报道的一些海生单细胞藻类相似^[2,14],对盐度的变化具有较强的适应能力。但不能由此推断它是海生种类,因为该藻更适于在较低盐度环境下生长,它更象一般所说的淡水生种类,在一些分类学文献中,也多将该种划在淡水生种类。事实上划为咸淡水种类更为合适。在河口,潮间带地区,由于盐度的变化幅度很大,判断其中生长的大量生物是淡水生还是海水生种类是有一定困难的。

2. 不同浓度 NaCl 对谷皮菱形藻主要光合色素的影响

硅藻含有两大类光合色素,即叶绿素和类胡萝卜素。在环境强制条件下,如高盐度、极端温度和 pH 值以及营养元素缺乏等条件下,都可能引起色素含量的变化^[9]。生长在不同 NaCl 浓度的培养基中的谷皮菱形藻,色素含量的变化并不明显,其叶绿素含量随 NaCl 浓度的增加略有下降,而类胡萝卜素相对几乎没有什么变化。从而导致类胡萝卜素/叶绿素比值呈现随生长盐度增加而增加的趋势(表 1)。这结果与已见报道的其它几种硅藻的情况相似^[6,7,11],与盐藻(*Dunaliella*)的几个种中类胡萝卜素含量随生长盐度的提高而大大增加的情况却截然不同^[9]。

表 1 生长在不同 NaCl 浓度下的谷皮菱形藻的色素含量

Tab. 1 Pigment contents of the diatom *Nitzschia palea* grown at different NaCl concentrations

NaCl 浓度 concentration of NaCl (mol/L)	Chl 含量(%干重) Contents of Chl (% DW)	Car 含量(%干重) Contents of Car (% DW)	Car/Chl
0.00	0.91	0.35	0.38
0.25	0.72	0.31	0.43
0.50	0.60	0.30	0.50
0.75	0.58	0.35	0.60
1.00	0.50	0.38	0.76

Chl: 叶绿素; Car: 类胡萝卜素; DW:dry weight.

3. 不同 NaCl 浓度对谷皮菱形藻代谢产物的影响

如前所述,谷皮菱形藻有较强的耐盐适应性。为了寻求其耐盐机理;同时因为这种硅藻被广泛用作有价值的饵料,也为了验证不同盐度下生长的谷皮菱形藻营养成份是否改变,我们对在不同 NaCl 条件下生长的谷皮菱形藻的代谢产物进行了分析。

表 2 说明,培养基中不同的盐度对谷皮菱形藻的蛋白质含量并无明显的影响,在试验范围内($\leq 1.00\text{mol/L}$ NaCl),蛋白质含量都约占细胞干重的 36% 左右。与蛋白质含量不同,谷皮菱形藻细胞内糖类的含量随生长培养基中 NaCl 浓度的增加而明显增加,高盐浓度(1.00mol/L)下生长的细胞中糖的含量较低盐浓度($\leq 0.25\text{mol/L}$)下的高 3—4 倍。显然,为了适应盐度变化,增加糖类的合成以维持细胞内外的渗透平衡,是该藻对外界环境中渗透压增加的一种生理调节反应。Hiller 和 Greenway^[4]曾报道蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)在高渗环境中可以增加糖类的合成。Paul^[15]也报道纺锤柱藻(*Cylindrotheca fusiformis*)能以游离蔗糖和甘露醇来调节渗透压。看来,藻细胞以糖类调节适应环境盐度变化已被证实。由于在高盐逆境中,藻细胞的光合作用并未受抑制,其蛋白质含量也无变化。那么适应盐度的糖调节可能是碳水化合物合成或代谢途径中涉及脂类和糖类转化的某种或某几种酶类作出的反应。

氨基酸往往以两种形式存在于细胞内,其中大部分结合形成蛋白质,少量以游离氨基酸存在于细胞质中。有些学者对氨基酸在单细胞硅藻耐盐适应调节中的作用进行了研

表2 生长在不同 NaCl 浓度下的谷皮菱形藻的代谢产物

Tab. 2 Metabolites of the diatom *Nitzschia palea* grown at different NaCl concentrations

NaCl 浓度 concentration of NaCl (mol/L)	蛋白质含量(%干重) Contents of protein (% DW)	糖含量(%干重) Contents of carbohydrate (% DW)
0.00	32.50	5.85
0.25	36.81	15.12
0.50	36.95	16.54
0.75	36.47	17.61
1.00	36.05	20.68

究,但结果很不一致^[7,12]。我们的实验结果显示,在 $\leq 0.75\text{mol/L}$ 的不同 NaCl 浓度的培养基中生长的谷皮菱形藻,其氨基酸含量随生长培养基中盐度的增加而明显增加(表3),在含 0.75mol/L 较之 0.25mol/L NaCl 培养基中生长的藻细胞的氨基酸含量约增加30%,特别是脯氨酸更为明显,几乎增加了80%。有人将这种现象解释为是由于盐度增加,减少了细胞对氨基酸总吸收,进而影响它们同化入蛋白质,而以游离氨基酸的形式积累在细胞质中^[12]。本数据虽是总氨基酸量,但由于藻细胞的蛋白质含量并不因盐度而变化。无疑这种氨基酸含量的改变系游离氨基酸部分随盐度不同而改变所致。显然,在盐度适应过程中,谷皮菱形藻细胞内的游离氨基酸在某种程度上也起着调节和维持细胞渗

表3 生长在不同 NaCl 浓度下的谷皮菱形藻的总氨基酸含量

Tab. 3 Total amino acid contents of the diatom *Nitzschia palea* at different NaCl concentrations

	氨基酸名称 Amino acids	氨基酸含量(%干重) Contents of amino acids (%DW)				
		0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
		(mol/LNaCl)				
必需氨基酸 Essential amino acids	异亮氨酸 ILE	2.15	3.29	3.88	4.19	2.85
	亮氨酸 LEU	3.20	4.88	6.19	7.13	4.59
	赖氨酸 LYS	1.78	2.97	3.14	3.92	2.59
	蛋氨酸 MET	0.42	1.14	1.32	1.68	0.77
	苯丙氨酸 PHE	2.12	3.38	4.00	4.42	2.98
	苏氨酸 THR	2.14	3.23	3.88	4.11	2.81
	缬氨酸 VAL	2.22	3.33	3.93	4.19	2.91
非必需氨基酸 Non-essential amino acids	丙氨酸 ALA	3.02	4.50	5.29	5.85	3.85
	精氨酸 ARG	2.79	4.47	4.66	5.10	3.10
	天冬氨酸 ASP	4.31	6.78	8.03	8.67	5.88
	胱氨酸 CYS	0.23	0.44	0.53	0.52	0.25
	谷氨酸 GLU	5.47	9.04	10.15	11.08	7.34
	甘氨酸 GLY	2.38	3.61	4.27	4.68	3.17
	组氨酸 HIS	0.62	1.04	1.25	1.38	0.91
	脯氨酸 PRO	1.94	3.09	4.18	5.45	3.90
	丝氨酸 SER	2.24	3.56	4.15	4.46	3.04
	酪氨酸 TYR	1.25	2.09	2.58	2.85	1.75

透平衡的作用。但这种调节是有一定限度的。当外界盐度高到一定程度,如在 1.00mol/L NaCl 中生长的藻细胞,其氨基酸含量不仅没有相应增加,反而下降,显示此时氨基酸失去了调节渗透的功能。这可能是有关氨基酸能否调节细胞渗透以适应环境盐度变化的报道结果不同的原因之一。

综上所述,谷皮菱形藻(*N. palea*)是一种广盐性硅藻,其最适生长盐度在 0.25 mol/L NaCl 左右,在 ≤ 1.00 mol/L 的 NaCl 盐度内,该藻都能生长;且其色素、蛋白质等含量随环境盐度变化并无明显变化,因此,无论是在淡水,半咸水或海水中的养殖生产上都可以作为育苗用的良好饵料进行培养。谷皮菱形藻适应盐度环境的生理调节物主要是糖类。在一定范围内,游离氨基酸特别是脯氨酸也起维持细胞渗透平衡的作用。关于其作用机理多半与有关酶类和细胞膜结构及功能等方面相关,尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 张宪孔等,1990,河蟹育苗适口饵料藻类的选育和培养。长江流域资源、生态、环境与经济开发研究论文集。科学出版社。
- [2] Ahmad, I. & Hellebust, J. A., 1985. Salinity responses of the marine microalga *Brachiomonas submarina* Bohlin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **88**: 45—53.
- [3] Arnon, D. I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.*, **24**: 1—5.
- [4] Ben-Amotz, A. & Avron, M., 1983. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**: 95—119.
- [5] Ben-Amotz, A. & Avron, M., 1983. On the factors which determine massive-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.*, **72**: 593—597.
- [6] Dühler, G. & Biermann, I., 1985. Effect of salinity on ^{15}N -ammonia and ^{15}N -nitrate assimilation of *Bellerophylla yucatanensis* and *Thalassiosira rotula*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **180**: 589—598.
- [7] Dühler, G. & Zink, J., 1985. Effect of salinity on photosynthetic $^{14}\text{CO}_2$ fixation amino acid pools of *Bellerophylla yucatanensis* (v. Stosch) and *Thalassiosira rotula*(Meunier). *Z. Naturforsch.*, **40c**: 527—530.
- [8] Guillard, R. R. I. 1973. Division rates. In Stein, J. R. (Ed.) *Handbook of Phycological methods: culture methods & growth measurements*. Cambridge University Press pp. 289.
- [9] Hellebust, J. A. 1976. Osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **27**: 485—505.
- [10] Kochert, G., 1978. Quantitation of the macromolecular components of microalgae. In Hellebust, J. A. & Craigie, J. S. (Ed.) *Handbook of phycological methods: Physiological and biochemical methods*. Cambridge University Press London. New York. Melbourne, pp. 189.
- [11] Liu, M. S. & Hellebust, J. A., 1976. Effect of salinity changes on growth and metabolism of the marine centric diatom *Cyclotella cryptica*. *Can. J. Bot.*, **54**: 930—937.
- [12] Liu, M. S. & Hellebust, J. A., 1976. Effect of salinity and osmolarity of the medium on amino acid metabolism in *Cyclotella cryptica*. *Can. J. Bot.*, **54**: 938—948.
- [13] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265—275.
- [14] McLachlan, J., 1961. The effect of salinity on growth and chlorophyll content in representative classes of unicellular marine algae. *Can. J. Microbiol.*, **7**: 399—406.
- [15] Paul, J. S., 1979. Osmoregulation in the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *J. Phycol.*, **15**: 280—284.
- [16] Vonshak, A., Guy, R. & Guy, M., 1988. The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. *Arch. Microbiol.*, **150**: 417—420.
- [17] Yopp, J. H., Tindall, D. R., Miller, D. M. & Schmid, W. E., 1978. Isolation, purification and evidence for a halophilic nature of the blue-green alga *Aphanorhece halophytica* Frey (Chroococcales). *Phycologia* **17**: 172—178.

ADAPTABILITY OF *NITZSCHIA PALEA* TO SALINITY

Liu Mei and Zhang Xiankong

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

Abstract

The response of *Nitzschia palea* to increase in NaCl concentration (0—1.0 mol/L) in the growth media was studied. The alga showed a wide adaptability to salinity. It was able to grow in media containing ≤ 1.0 mol/L NaCl, and optimal growth was observed at 0.25 mol/L NaCl ($S_{\text{‰}}=18_{\text{‰}}$). The contents of main biochemical constituents of cells grown at different NaCl concentrations varied various degrees. A slight increase in the ratio of carotinoid to chlorophyll was observed with increasing salinity due to a decrease in chlorophyll content in the cells. There was no significantly variation in protein content of the cells grown in the media with different levels of NaCl. However, the relationship between the carbohydrate content and the NaCl concentration was found to be linear. Moreover, the total amino acid contents of *N. palea* increased markedly with increases in NaCl concentration from 0 to 0.75 mol/L in growth media. The results suggested that carbohydrates and free amino acids in the cells of *N. palea* were major osmotic regulators during adaptation to external salinity changes.

Key words *Nitzschia palea* (diatom), Salinity adaptability, Osmoregulation