

Fe³⁺对浮游颤藻生长和光合作用的影响

吕秀平¹ 胡晗华² 张栩¹ 丛威² 谭天伟¹

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院,北京 100029; 2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室,北京 100080)

摘要: 考察了浓度为 0—30 nmol/L 的范围内, Fe³⁺ 对浮游颤藻 (*Oscillatoria planctonica* Woloszynska) 的生长、生化组成和光合作用的影响。结果表明, 当 Fe³⁺ 浓度小于 10 nmol/L 时, 浮游颤藻的生长以及叶绿素和蛋白质的合成均受到明显的抑制, 对其补铁后这种抑制能够得到一定程度的缓解。当 Fe³⁺ 浓度达到 10 nmol/L 时, 最大生物量与比生长速率分别是不加铁时的 3 倍和 4 倍。富铁条件下藻细胞光饱和的光合作用速率 (P_m)、暗呼吸速率 (R_d) 和表观光合作用效率 (φ) 显著大于缺铁条件, 而光补偿点 I_c 及饱和光强 I_k 则低于缺铁条件。结果显示, 铁是浮游颤藻生长的重要限制因子。

关键词: 浮游颤藻; Fe³⁺; 生长; 光合作用

中图分类号: Q178.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)03-0318-05

近年来, 人们陆续发现海洋中有许多高营养盐低叶绿素 (High nutrient, low chlorophyll, HNLC) 区域, 总面积超过整个大洋的 20%, 区域中氮、磷等营养盐很丰富, 但叶绿素含量很低, 可溶性铁的含量也很低^[1,2]。Martin 等^[3]提出了部分海域浮游植物生长中铁的限制性作用假说: 生物可利用铁的缺乏, 限制了大洋 HNLC 区域的浮游植物的生长。

在浮游植物的生长过程中, 电子传递, 氧的新陈代谢, 氮的吸收利用, 叶绿素的光合作用, 呼吸作用等都需要铁^[4,5]。近年来, 围绕铁的限制性作用, 国内外一些研究工作主要侧重于海水中的不同形式的铁对浮游植物生长的影响^[6,7], 以及铁对海洋浮游植物的增殖和群落组成的影响等^[8,9]。但是, 有关铁对湖泊中浮游植物的影响却很少关注^[10]。铁作为浮游植物生长的限制因子, 不仅表现在开放式大洋中, 在湖泊中也存在^[11]。本文选择一种常见水华蓝藻——浮游颤藻为材料, 研究 Fe³⁺ 对其生长, 叶绿素、蛋白质等生化组成以及光合放氧的影响, 分析浮游颤藻对 Fe³⁺ 限制的响应范围, 以期为湖泊中水华爆发与铁的关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 浮游颤藻 (*Oscillatoria planctonica* Woloszynska) 由中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库 (FACHB) 提供。采用 BG11 培养基培养 (初始 pH7.1)。

1.2 器皿处理 为减少铁污染, 所用的玻璃器皿均在 1 mol/L HCl 中浸泡 2—3d, 用超纯水冲洗干净, 在 60℃ 烘干, 121℃ 下高压灭菌 20min 后备用。

1.3 培养方法和条件 先配制无铁的 BG11 培养基, 灭菌后备用。用柠檬酸铁铵配制 1 mmol/L 的 Fe³⁺ 贮备液, 加入到无铁的 BG11 培养基中, 使 Fe³⁺ 浓度分别为 0、10、100、1000、10000 和 30000 nmol/L。培养条件为: 温度 (22 ±1)℃, 光强为 60 μmol photons/m²/s, 光暗周期 L/D 为 12h/12h, 在光照培养箱中培养。先用 BG11 培养基做批次培养, 生长到对数期时离心 (3000 r/min, 5 min) 收集细胞, 用无铁的 BG11 培养基洗涤 2 次去铁, 再用适量的无铁 BG11 培养基重悬。取少量重悬藻液作种源加入到不同 Fe³⁺ 浓度的 250 mL 锥形瓶中培养, 培养期间, 每天定时摇动 3—4 次。在藻细胞的对数生长期后期向 Fe³⁺ 浓度低的培养瓶中补铁继续培养, 检测细胞生长、叶绿素

收稿日期: 2004-06-17; 修订日期: 2004-07-18

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973) 资助项目 (2002CB412306)

作者简介: 吕秀平 (1979—), 女, 吉林省农安县人; 北京化工大学硕士

通讯作者: 胡晗华, hanhuahu@ihb.ac.cn

及蛋白质的变化。

1.4 生长曲线的测定 用 721 分光光度计测定光密度值($\text{OD}_{750\text{nm}}$)以确定藻的生长情况;通过校正曲线 $gDWL^{-1} = 0.5584 \text{ OD}_{750\text{nm}} - 0.0059$ ($n = 10$, $P < 0.01$)换算成干重,求出生长曲线。并按下列公式计算藻细胞的比生长速率(μ): $\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$, 其中 t_1, t_2 为培养时间; N_1, N_2 分别为培养 t_1, t_2 时的细胞密度。

1.5 叶绿素 a 含量的测定 离心(3000 r/min, 5min)收集藻细胞后,加入适量 90% 的丙酮,在 4 黑暗下抽提 24h,然后 4000r 离心 10min,取上清液,以 90% 的丙酮为空白,测定其在 664nm 波长下的光吸收值,用公式 $\text{Chl } a (\mu\text{g/mL}) = 11.41 \times \text{OD}_{664}$ 计算 $\text{Chl } a$ 的含量。

1.6 蛋白质的测定 将藻液在 4000r 下离心 10min,用蒸馏水洗涤 2 次后,超声破碎,用修正的 Lowry 法^[12]确定样品蛋白的含量。

1.7 光合放氧活性的测定 温度由循环水浴控制在 22 ± 0.5 ,光合作用光饱和曲线(P-I)由氧电极(英国 Hansatech 公司)测定。根据 Henley^[13]的方法,以方程 $P = P_m \times \tanh(\alpha \times I / P_m) + R_d$ 对实验数据进行非线性参数拟合,并计算出各种参数。其中 I 为光照强度; P 是光照强度为 I 时的光合作用速率; P_m 为最大光合作用速率; α 是光合作用在光限制部分的初始斜率; R_d 为暗呼吸速率; I_k 表示光饱和点($I_k = P_m / \alpha$); I_c 表示光补偿点($I_c = R_d / \alpha$)。

2 结果与讨论

2.1 不同 Fe^{3+} 浓度下浮游颤藻的生长曲线

Fe^{3+} 浓度为 0—30000 nmol/L 时,浮游颤藻的生长曲线如图 1 所示。其中,在 Fe^{3+} 浓度分别为 0 和 10 nmol/L 的低铁条件下,细胞生长缓慢。在 10d 时的生物量分别为 0.16 g/L 和 0.18 g/L。在 11d 时补加 100 nmol/L 的铁,能够使两种低铁培养条件下的藻细胞生物量分别达到 0.25 g/L 和 0.27 g/L。在 100 nmol/L 和 1000 nmol/L 的 Fe^{3+} 浓度下,浮游颤藻的生长曲线大致相同,最大生物量分别为 0.27 g/L 和 0.28 g/L。在铁浓度为 30000 nmol/L 的条件下,最大生物量达到了 0.43 g/L,与 Fe^{3+} 浓度为 10000 nmol/L 时的最大生物量相当。结果表明, Fe^{3+} 浓度高于 10000 nmol/L 时趋于饱和。同时, Fe^{3+} 浓度不同对浮游颤藻生长曲线的影响,前 5d 尚不明显,从第 6d 开始影响渐为明显。

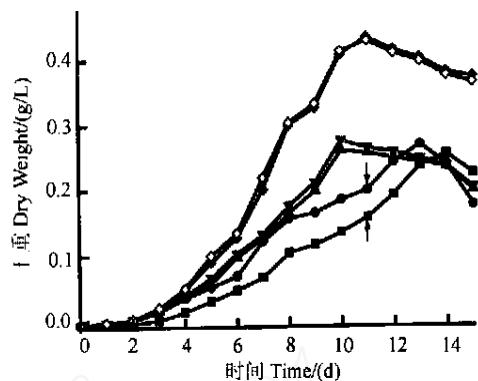


图 1 浮游颤藻的生长曲线

Fig. 1 The batch growth curves of *O. planctonica*
0 (○), 10 nmol/L (●), 100 nmol/L (□), 1000 nmol/L (▼),
10000 nmol/L (△), 30000 nmol/L (▲);
箭头表示在该点补铁 Arrows indicating the addition of Fe

在 Fe^{3+} 浓度分别为 0 和 10 nmol/L 时,对数生长期的比生长速率为 0.11 d^{-1} 和 0.25 d^{-1} ;而在 Fe^{3+} 浓度分别为 100 nmol/L 和 1000 nmol/L 时,对数期的比生长速率为 0.27 d^{-1} 和 0.29 d^{-1} ;当 Fe^{3+} 浓度达到 10000 nmol/L 时,对数期的比生长速率达到最大值,为 0.4 d^{-1} ,是不加铁条件下的 3.6 倍。 Fe^{3+} 浓度在 30000 nmol/L 时的比生长速率(0.33 d^{-1})则略低于 10000 nmol/L 时的比生长速率(图 2)。图 2 显示藻细胞的比生长速率很大程度受 Fe^{3+} 浓度的影响,缺铁导致细胞分裂减慢。

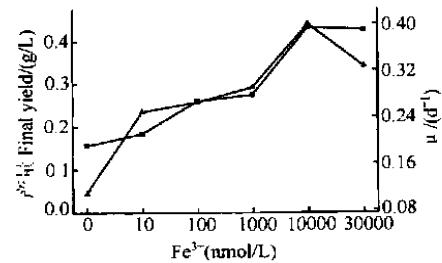


图 2 浮游颤藻在不同 Fe^{3+} 浓度下的最大生物量(○)和对数期比生长速率(●)

Fig. 2 Final yields (○) and specific growth rate (μ) (●) of *O. planctonica* as a function of Fe^{3+} concentrations

以上结果表明,铁是限制浮游颤藻生长的重要因子,在一定浓度范围内能够触发细胞的生长和分裂,超过一定浓度后可能产生毒性,不利于其生长。在缺铁状态(0—10 nmol/L)下,及时补铁,能够使藻细胞在较短的时间内恢复正常状态。10000—30000 nmol/L Fe^{3+} 浓度已接近或达到浮游颤藻生长的饱和浓度,属于富铁状态。100—1000 nmol/L,是

属于一个铁受限状态,对于浮游颤藻可能在这个区间内存在一个生长的“临界 Fe^{3+} 浓度”,高于此浓度,生长向良好的方向发展,并可能达到较高的细胞密度;低于此浓度生理活性受到抑制,生长处于不良状态,生物量处于低水平。

2.2 Fe^{3+} 对浮游颤藻叶绿素 a 含量的影响

图3所示为不同 Fe^{3+} 浓度下浮游颤藻叶绿素 a 含量的变化曲线。从第5d开始,不同 Fe^{3+} 浓度对叶绿素 a 含量的影响变得显著。在第10d, Fe^{3+} 浓度为0和10nmol/L时的叶绿素 a 含量分别为0.17 $\mu g/mL$ 和0.21 $\mu g/mL$;在第11d补铁,与生长曲线的变化不同,叶绿素 a 含量并没有显著上升,最大值只达到了0.32 $\mu g/mL$ 和0.33 $\mu g/mL$ 。100 nmol/L 和1000 nmol/L 时的叶绿素 a 含量大致相同,在接近第9d时达到最大值,均为0.41 $\mu g/mL$ 。10000 nmol/L 的 Fe^{3+} 浓度下,叶绿素 a 含量在第10d达到最大值1.28 $\mu g/mL$,而 Fe^{3+} 浓度为30000 nmol/L 在第9d达到最大值1.10 $\mu g/mL$ 。这说明 Fe^{3+} 浓度高于10000 nmol/L时,不利于浮游颤藻叶绿素 a 的积累。

对数生长后期(从第7d开始), Fe^{3+} 对藻细胞叶绿素 a 的合成有明显影响,在10000 nmol/L 和30000 nmol/L 的 Fe^{3+} 浓度下,叶绿素 a 含量较高;而在0和10 nmol/L 的 Fe^{3+} 浓度下叶绿素的合成明显受到抑制,只及前者的10%—20%,补 Fe^{3+} 也不能增加叶绿素 a 的合成。因此,叶绿素 a 的生物合成离不开铁,缺铁使浮游颤藻叶绿素 a 的含量大大降低,从而减少光能的吸收利用,导致细胞光合作用能力下降。

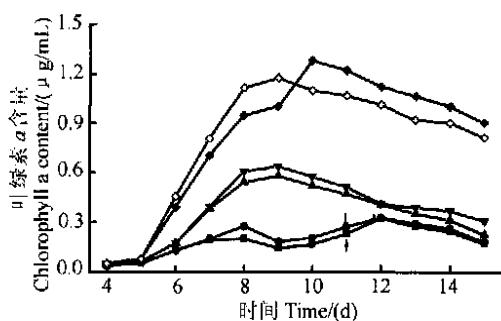


图3 在 Fe^{3+} 浓度分别是0—30000 nmol/L时浮游颤藻叶绿素 a 含量的变化曲线

Fig.3 The chlorophyll a contents of *O. planctonica* in the medium with Fe^{3+} concentrations of 0—30000 nmol/L; 0(○), 10 nmol/L(●), 100 nmol/L(□), 1000 nmol/L(▼), 10000 nmol/L(◇);
箭头表示在该点补铁 Arrows indicating the addition of Fe

2.3 Fe^{3+} 对浮游颤藻蛋白质含量的影响

比较不同 Fe^{3+} 浓度下浮游颤藻蛋白质含量的变化(图4)可以看出,随着 Fe^{3+} 浓度的升高,浮游颤藻对蛋白质的积累也随之增大,在10000 nmol/L 的 Fe^{3+} 浓度下蛋白质含量最大值为0.10 g/L,而在30000 nmol/L Fe^{3+} 浓度下,最大含量为0.09 g/L。在第11d时对 Fe^{3+} 浓度为0和10 nmol/L 培养瓶中补 Fe^{3+} ,蛋白质含量很快恢复到较高水平,约为0.05 g/L。

从实验结果来看,蛋白含量与铁的营养状况密切相关。与铁丰富条件下的细胞相比,在低铁浓度下的藻细胞蛋白含量较低,而且能够在补铁的条件下很快恢复较高水平,说明铁对蛋白质含量的变化影响很大。

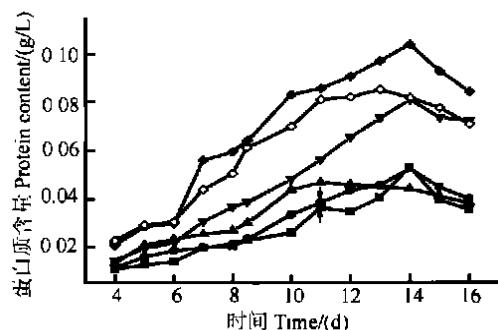


图4 在 Fe^{3+} 浓度分别是0—30000 nmol/L时浮游颤藻的蛋白质含量变化曲线

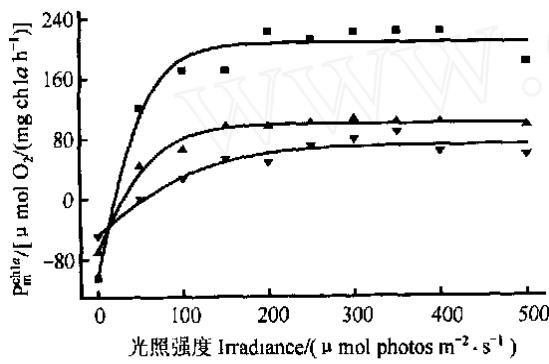
Fig.4 The protein contents of *O. planctonica* in the medium with Fe^{3+} concentrations of 0—30000 nmol/L; 0(○), 10 nmol/L(●), 100 nmol/L(□), 1000 nmol/L(▼), 10000 nmol/L(◇), 30000 nmol/L(●);
箭头表示在该点补铁 Arrows indicating the addition of Fe

2.4 Fe^{3+} 对浮游颤藻光合作用的影响

以叶绿素 a 为基准,分别测定浮游颤藻在 Fe^{3+} 浓度为0 nmol/L(缺铁)、100 nmol/L(受限)和10000 nmol/L(富铁)三种条件下的光合作用对光强的响应曲线(图5),得到的光合作用参数如表1所示。其中光饱和的光合作用速率(P_m),暗呼吸速率(R_d)和表观光合作用效率(ϕ)都随 Fe^{3+} 浓度的增加而增加,而饱和光强(I_k)和光补偿点(I_c)则降低。比较富铁(10000 nmol/L)和缺铁(0 nmol/L)两种条件, P_m 提高了1.6倍, R_d 提高了1.2倍。相反,低铁条件下 I_k 和 I_c 均增加。

表1 不同 Fe^{3+} 浓度下浮游颤藻光合作用对光强的响应曲线参数Tab. 1 Photosynthetic parameters of 0, 100 nmol/L and 10000 nmol/L Fe^{3+} cultures of *O. planctonica*

光合作用参数 Photosynthetic parameters	Fe^{3+} (nmol/L)		
	0	100	10000
P_m [$\mu\text{mol O}_2(\text{mg chl} a \text{ h})^{-1}$]	118.60 \pm 11.38	167.35 \pm 7.78	308.97 \pm 21.60
$[\mu\text{mol O}_2(\text{mg chl} a \text{ h})^{-1} \cdot (\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1})^{-1}]$	0.91 \pm 0.21	2.38 \pm 0.27	5.17 \pm 0.90
R_d [$\mu\text{mol O}_2(\text{mg chl} a \text{ h})^{-1}$]	- 47.183 \pm 10.16	- 68.02 \pm 7.36	- 101.66 \pm 20.36
I_k [$\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	129.79	70.43	59.8
I_c [$\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	51.75	28.63	19.68

图5 不同铁浓度下以叶绿素 *a* 为基准的浮游颤藻光合作用对光强的响应曲线Fig. 5 Representative curves of chl *a* - specific photosynthesis versus irradiance 0 (▼), 100 nmol/L (□), 10000 nmol/L (○)

由此说明,浮游颤藻通过吸收利用 Fe^{3+} 增加光合色素对光量子的吸收,以及相关酶的活性来提高光合作用能力,同时促进呼吸速率。当浮游颤藻生长处于铁受限和缺铁条件下,通过提高 I_k 和 I_c 来满足藻类进行光合作用的需要^[14]。其原因在于,浮游颤藻对 Fe^{3+} 吸收利用可能与光系统中 Fe-S 蛋白的合成有关,缺铁可以使 Fe-S 蛋白的含量减少,降低电子传递的能力和效率,光合作用能力减弱。

3 结论

由此可见,在其他营养盐丰富的条件下, Fe^{3+} 浓度的变化对浮游颤藻的生长、生化组成及光合作用均有显著影响。随着 Fe^{3+} 浓度的增加,浮游颤藻的生长有加快的趋势。富铁条件下细胞最大生物量、叶绿素 *a* 含量和蛋白质含量分别是缺铁条件下的 2.7、7.5 和 3.3 倍。适时补铁能够触发藻细胞的生长,但对叶绿素 *a* 的合成影响则较小。从不同 Fe^{3+} 浓度对浮游颤藻光合作用的影响来看,与铁丰富条件下的细胞相比,缺铁条件下细胞光饱和的光合作用速率、暗呼吸速率和表观光合作用效率降低,缺铁下的细胞光

合作用需要更高的光强 I 达到饱和。可见,铁对浮游颤藻的光合作用能力有显著影响。浮游颤藻在铁限制条件下,发生一些生理变化,这些生理变化反映了能量代谢以及在铁分配利用上的变化,而这些变化反过来又会影响细胞的生长及生化组成(如叶绿素和蛋白质等)。所以,铁是浮游颤藻生长和光合作用的限制因子之一,结合其他限制因子,就有可能为蓝藻水华的预报提供重要的理论依据。

参考文献:

- [1] Boya P W, Watson A J, Law C S, et al. A mesoscale phytoplankton bloom in the polar Southern Ocean stimulated by iron fertilization [J]. *Nature*, 2000, 407: 695—702
- [2] Cao Y, Li D, Zhang J. Progress in the research of iron limitation to marine phytoplankton [J]. *Marine Science Bulletin*, 2002, 21: 83—90 [曹勇, 李道季, 张经. 海洋浮游植物铁限制的研究进展. 海洋通报, 2002, 21: 83—90]
- [3] Martin J H, Gordon M R, Fitzwater S E. The case of iron [J]. *Limnology and Oceanography*, 1991, 36: 1793—1802
- [4] Flynn K J, Hipkin C R. Interactions between iron, light, ammonium and nitrite: insights from the construction of a dynamic model of algal physiology [J]. *Journal of Phycology*, 1999, 35: 1171—1190
- [5] Geider R J. Complex lessons of iron uptake [J]. *Nature*, 1999, 400: 815—816
- [6] Chen C, Zhou C, Zheng A, et al. Limitation of environmental factors on propagation of *Skeletonema costatum* [J]. *Marine Science Bulletin*, 1996, 15: 37—42 [陈慈美, 周慈由, 郑爱榕, 等. 中肋骨条藻增殖的环境制约作用——Fe(+) 与 N、Mn、光、温交互作用对藻生化组成的影响. 海洋通报, 1996, 15: 37—42]
- [7] Zou D, Han Z, Wu B. Effects of iron on the growth and photosynthesis of red tide diatom *Pseudonitzschia pungens* Grunow [J]. *Journal of Jinan University (Natural Science)*, 2002, 23: 81—87 [左冬梅, 韩志国, 武宝. 铁对尖刺拟菱形藻生长及光合作用的影响. 暨南大学学报(自然科学版), 2002, 23: 81—87]
- [8] Lin Y, Zhuang D, Chen X, et al. Preliminary study on red tide formation based on results from enclosed experimental ecosystems—the relationship between diatom red tide with some physical and chemical factors [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1994, 25: 139—145 [林

- 昱,庄栋法,陈孝麟,等.初析赤潮成因研究的围隔实验结果——几个理化因子与硅藻赤潮的关系.海洋与湖沼,1994,25:139—145]
- [9] Coale K H,Johnson K S,Fitzwater S E, et al. A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the Equatorial Pacific Ocean[J]. *Nature*, 1996, **383**:495—501
- [10] Twiss M R,Auclair J-C,Charlton M N. An investigation into iron-stimulated phytoplankton productivity in epipelagic Lake Erie during thermal stratification using trace metal clean techniques[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2000, **57**:86—95
- [11] Evans J C,Prepas E E. Relative importance of iron and molybdenum in restricting phytoplankton biomass in high phosphorus saline lakes[J]. *Limnology and Oceanography*, 1997, **42**:461—472
- [12] Markwell M A K,Haas S M,Bieber L L, et al. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples[J]. *Analytical Biochemistry*, 1978, **87**:206—210
- [13] Henley W J. Measurement and interpretation of photosynthetic light response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes [J]. *Journal of Phycology*, 1993, **29**: 729—739
- [14] Fu F,Bell P R F. Growth, N_2 fixation and photosynthesis in a cyanobacterium, *Trichodesmium* sp., under Fe stress[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**:645—649

EFFECTS OF Fe^{3+} ON GROWTH AND PHOTOSYNTHESIS OF OSCILLATORIA PLANCTONICA

L ÜXiū Ping¹, HU Han-Hua², ZHANG Xu¹, CONG Wei² and TAN Tian-Wei¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract : Fe was suspected as a limiting factor controlling phytoplankton abundance in certain areas of the open ocean. Some experiments have been run to examine growth limitation of oceanic and coastal species as a function of Fe^{3+} concentrations. Few studies are conducted corresponding the effect of Fe^{3+} concentrations on algae in lake. *Oscillatoria plantonica* Woloszynska, a bloom-forming cyanobacterium, was grown in Fe-deficient and Fe-replete batch cultures using ambient levels of physical factors in natural blooms and in BG11 media. The characteristics of growth, biochemical composition and photosynthesis of *Oscillatoria plantonica* under Fe^{3+} concentrations between 0—30 mmol/L were covered in this paper. The results showed that the growth and biochemical composition (chlorophyll *a* and protein contents) were limited when Fe^{3+} was below 10 nmol/L and were alleviated by the addition of Fe^{3+} . When the Fe^{3+} concentration reached 10 mmol/L, the final yields and specific growth rate were 3 and 4 times respectively compared with those under zero added Fe^{3+} condition. Chlorophyll *a* specific light-saturated photosynthetic rate (P_m), dark respiration rate (R_d) and apparent photosynthetic efficiency () under Fe-replete conditions were significantly higher than those under Fe-limited conditions, whereas light saturated point (I_s) and light compensatory point (I_c) showed the contrary. It is evident that Fe deficiency imposed a restriction on the growth and division of *Oscillatoria plantonica* cells.

Key words : *Oscillatoria plantonica*; Fe^{3+} ; Growth; Photosynthesis