

氮磷营养盐对微氏海链藻细胞生化组成的影响

李顺兴^{1,2}, 郑凤英², 洪华生¹, 黄邦钦¹, 王大志¹, 林慧琴², 林玲²

(1. 厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 漳州师范学院 化学系, 福建 漳州 363000)

摘要: 探讨了高营养盐条件下氮浓度及氮磷摩尔比 [$n(N):n(P)$] 异动对微氏海链藻 (*Thalassiosira weissflogii*) 的细胞碱性活性基团含量、细胞干质量、细胞形态及细胞体中碳水化合物、蛋白质、叶绿素含量, 即对细胞生命力和表面吸附力的影响。结果表明, $n(N):n(P)=16$ 时, 叶绿素、碳水化合物和蛋白质含量最高, 生长状况及生命力最佳, 有利于金属吸收; $n(N):n(P)$ 偏离 16, 各组份含量均减少。碱性活性基团和藻细胞大小, 当 $n(N):n(P)=8$ 时最大, 表面吸附金属能力最强; $n(N):n(P)=64$ 时最小, 不利于金属的吸附。氮磷摩尔比对微氏海链藻细胞体主动吸收和生物吸附金属的影响不同。

关键词: 营养盐; 生化组成; 植物营养学; 海洋浮游植物; 微氏海链藻 (*Thalassiosira weissflogii*)

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2006)01-0049-05

2000~2004 年中国海洋环境质量公报表明全海域海水中的主要污染物是无机氮和磷酸盐, 监测河口海域普遍成为营养盐高值区^[1]。营养盐对微量金属的生物地球化学循环起着极其重要的作用, 国际地圈-生物圈计划 (IGBP) 中的全球海洋通量联合研究 (JGOFS) 和海岸带陆海相互作用 (LOICZ) 等国际性研究计划中都同时包括营养盐和微量金属问题。一般情况下, 海洋浮游植物按 Redfield 比值 [$n(N):n(P)=16$] 自海水中吸收营养盐, 大量营养盐的输入导致营养盐浓度及其比例的改变, 对海洋生态系统^[2]和痕量金属的吸收^[3]产生显著影响, 但影响机制未见报道。

营养盐水平影响浮游植物生化组成的研究目前主要有蛋白质、碳水化合物、藻体的氮磷、类脂物、叶绿素 a、酶活性和胞外多糖等^[4-7]; 但在高营养盐条件下对藻生化组成的影响, 特别是对吸收、吸附微量金属能力的影响, 即考察与之相关的细胞生命力、细胞表面积、细胞形态, 特别是与之密切相关的细胞壁活性基团含量的影响研究未见报道, 相关研究有助于对微量金属的生物地球化学循环以及富营养化对该循环的干扰效应的理解。

微氏海链藻是海洋硅藻的模式种之一、优良的开

口饵料^[8]。作者研究了氮磷浓度及其比值变化对微氏海链藻吸收/吸附微量金属密切相关的生化组成、细胞生命力、表面状态的影响, 为高营养盐区海链藻对营养盐水平异动的适应策略研究, 为海洋浮游植物营养学, 特别是海洋浮游植物吸收/吸附金属研究提供背景数据。

1 材料与方法

1.1 材料

756PC 紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); 双人单面超净工作台 (苏州净化设备有限公司); PYX-250Z-C 振荡培养箱 (厦门精益兴业科技有限公司); 电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司);

收稿日期: 2005-01-20; 修回日期: 2005-06-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40131160735, 40506020); 福建省科技三项费用资助项目 (K02093); 福建省青年科技人才创新项目 (2003J035); 福建省教育厅 A 类项目 (JA00233)

作者简介: 李顺兴 (1971-), 男, 福建漳州人, 博士, 副教授, 研究方向为微量金属形态与生物可给性, E-mail: lishunxing@fjzs.edu.cn

生物显微镜 (Motic Co.); 0.1 mL 浮游植物计数板; 320-S pH 计 (Mettler-Toledo Co.)

以硝酸钾配制 N 标准贮备液(0.1g/L); 以磷酸二氢钾配制 P 标准贮备液(50 mg/L); 钼酸盐溶液: 将 13g 钼酸铵溶于 100 mL 水中, 另溶解 0.35 g 酒石酸锑钾于 100 mL 水中, 在不断搅拌下, 将钼酸铵溶液加到 300 mL 9 mol/L 硫酸中, 再加酒石酸锑钾溶液, 混匀, 暗冷处储存。所用药品均为分析纯。溶液均以二次亚沸水配制。

1.2 方法

1.2.1 海水的处理

海水取高潮时厦门外海海水。滤膜 (0.2 μm) 用 1 mol/L HNO_3 浸泡 6 h, 用亚沸水多次清洗, 直到清洗液 pH 值为 7 为止。海水用处理过的滤膜抽滤, 除去水中的微生物 (包括细菌) 和颗粒物; 调 pH 至 8.0, 用紫外光照射后备用。

1.2.2 氮磷浓度的测定

取 1 mL 海水, 加 0.2 mL 1 mol/L HCl, 0.2 mL 0.1 g/L 氨基磺酸, 8.6 mL 水, 于 $\lambda_{220\text{nm}}$ 处比色测定氮浓度; 另取 1 mL 洁净海水, 加 0.2 mL 10 g/L 抗坏血酸放置 30 s 后, 加 0.4 mL 钼酸盐溶液及 8.4 mL 水, 放置 15 min 后, 于 $\lambda_{570\text{nm}}$ 处比色测定磷浓度。平行测定 6 次, 取平均值。测得实验所用海水的氮和磷的背景值分别为 24 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 氮磷摩尔比为 48。

1.2.3 藻种及培养条件

微氏海链藻 (*Thalassiosira weissflogii*) 原种取自厦门海峡, 由厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室分离、纯化培养。在天然海水中添加 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 5 $\mu\text{mol/L}$, 调 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度分别为 40, 80, 160, 320 $\mu\text{mol/L}$, 即氮磷摩尔比分别为 8, 16, 32, 64, 调 pH 8.0, 加培养基, 灭菌条件下接种, 于光强 140 lx、光暗比 14 h:10 h、19 $^\circ\text{C}$ 下培养。间隔 24 h 监测培养液中氮、磷浓度, 适时补充, 保持氮磷浓度和比值不变。

1.2.4 测定方法

藻细胞密度的测定采用细胞计数法, 藻液用 Lugol 氏液固定, 浮游植物计数板计数。藻细胞形态采用摄像法, 以戊二醛固定藻液, 在台式显微镜下拍摄细胞形态。叶绿素 a、碳水化合物、蛋白质含量分别用分光光度法^[9]、硫酚法^[10]、紫外吸收法^[11] 测定。

藻干质量的测定: 在 105 $^\circ\text{C}$ 下将清洗干净的 0.2 μm 滤膜烘干至恒质量, 在滤膜上作标记, 称质量。用处理后的滤膜抽滤 500 mL 准确计数后的海藻培养

液, 在 105 $^\circ\text{C}$ 下烘干至恒质量, 称质量, 前后质量差即为海藻质量, 再除以海藻总数即得每个海藻的干质量。

酸碱滴定法测细胞壁碱性活性基团: 取 6 份藻液 500 mL, 计数, 3 份为一组, 一组在 25 $^\circ\text{C}$ 下(海藻生长适宜温度为 19 $^\circ\text{C}$ 在 25 $^\circ\text{C}$ 下滴定以抑制海藻活性) 用 0.1 mol/L HCl 滴定至 pH =8.1 (pH 值须保持 20s 不变), 记录 HCl 滴定用量; 另一组在低压下过滤, 用同法滴定滤液至 pH=8.1, 记录 HCl 滴定用量。2 份盐酸平均用量之差即为细胞壁碱性基团所耗盐酸的量, 再除以藻液中海藻总数, 得每个藻细胞消耗的盐酸用量。

上述实验均平行测定 6 次, 取平均值。

2 结果与讨论

2.1 营养盐对细胞壁碱性基团含量及细胞形态的影响

海洋浮游植物通过细胞壁上的氨基、巯基、羰基、咪唑、磷酸根、硫酸根、酚羟基和酰胺等活性功能团^[12] 与痕量金属结合而形成类似三元表面络合物^[13,14]; 活性功能团以碱性基团为主, 可用酸碱滴定法表征其含量。氮磷摩尔比对藻细胞壁碱性活性基团相对含量的影响见图 1。

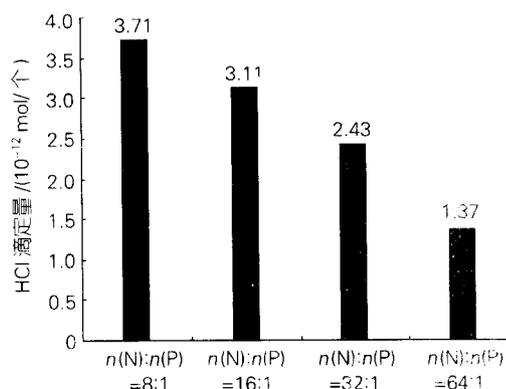


图 1 氮磷摩尔比对细胞壁碱性基团含量的影响

Fig.1 Effect of n(N):n(P) on the content of basic group

当 n(N):n(P)=8:1 时, 每个藻细胞壁的碱性活性基团的盐酸平均消耗量最大, 随着氮磷摩尔比增大, 盐酸消耗量降低。生物表面吸附是吸收痕量金属和营养物质的关键步骤。当氮磷摩尔比低于 Redfield 比值,

藻体通过扩大藻细胞的表面积,增加碱性活性基团含量,增大与海水接触面,利于营养盐和微量金属的吸附,随着氮磷摩尔比增大,藻表面积缩小,细胞壁碱性基团含量减少,吸附金属能力下降。

从图 2 可得,氮磷摩尔比增大,细胞表面积减

小;当氮磷摩尔比为 8 和 64 时,偏离 Redfield 比值较大,细胞形状呈长条形,发生变形;氮磷摩尔比为 16 和 32 时,细胞呈正常的正方体。细胞形态变化趋势与酸碱滴定法测定的细胞壁活性功能基团含量结果相吻合。

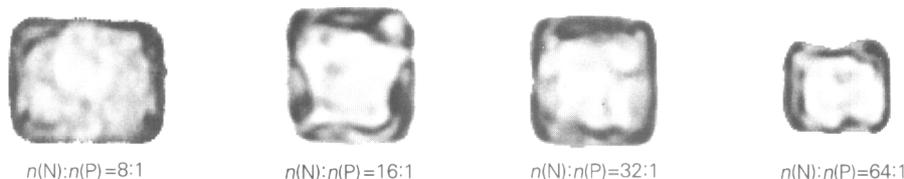


图 2 氮磷摩尔比对细胞形态的影响

Fig.2 Effects of $n(N):n(P)$ on the cell shape

2.2 营养盐对碳水化合物和蛋白质含量的影响

碳水化合物是海洋浮游植物光合作用的直接产物,并可转化为蛋白质。氮磷摩尔比对海链藻中碳水化合物和蛋白质含量影响见图 3。当氮磷摩尔比 16 时,藻的碳水化合物、蛋白质含量最高,分别为 8.39, 2.38 $\mu\text{g}/\text{个}$,分别是氮磷摩尔比 64 时的 1.66, 1.77 倍。氮磷摩尔比与海洋浮游植物中蛋白质的合成密切相关,氮的含量显著影响碳水化合物向蛋白质的转换。当氮磷摩尔比为 8 时,蛋白质的组成成分——氮相对不足,蛋白质的合成受限制;当氮磷摩尔比大于 16 时,蛋白质的合成受影响,浮游植物生长受抑制。海洋浮游植物光合产物蛋白质与碳水化合物之比 (P/C) 可反映在不同营养盐水平下浮游植物的生长状态、营养状态指标;同时,蛋白质、多糖组分中的氨基、羧基、羟基、醛基以及硫酸根也是细胞壁、细胞质对微量金属的共价结合位,可与微量金属进行络合,从而对微量金属的吸附和吸收产生影响。当氮磷摩尔比为 16 时, P/C 值最高,海链藻处于最佳生长状态,藻体活力最强,对环境中微量金属的吸收性能较好。

2.3 营养盐对叶绿素 a 含量的影响

叶绿素是浮游植物进行光合作用的重要物质,叶绿素 a 含量用来估算初级生产力,也是浮游植物生命力的重要表征。叶绿素 a 是一种色素——蛋白质复合物,它的合成离不开氮,当培养介质中氮含量相对缺乏时,必然限制藻体中叶绿素 a 的合成。营养盐对叶绿素 a 含量的影响情况见图 4。

当氮磷摩尔比为 8 时,氮相对不足,限制叶绿素 a 合成,藻体中叶绿素 a 含量最低;氮磷摩尔比为 16 时,海链藻处于最佳生长状况,生命力最强,对微量

金属的主动吸收能力强,叶绿素 a 含量最高,为 1.12 $\text{ng}/\text{个}$,为氮磷摩尔比为 8 时的 2.2 倍;氮磷摩尔比大于 16 时,海链藻生长受抑制,对合成叶绿素不利,所以藻体中各种叶绿素含量均下降。

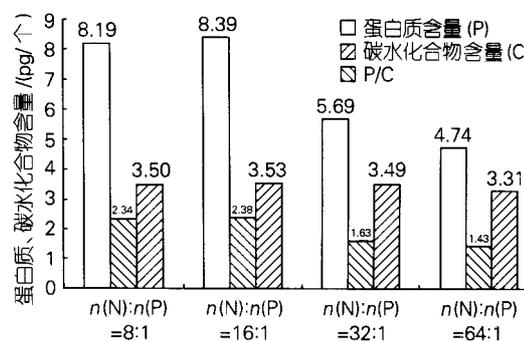


图 3 氮磷摩尔比对蛋白质 (P)、碳水化合物 (C) 含量的影响

Fig.3 Effect of $n(N):n(P)$ on the contents of protein and carbohydrate

2.4 营养盐对海藻细胞干质量的影响

海链藻细胞干质量的测定结果见图 5。当氮磷摩尔比为 16 时,海链藻处于最佳生长状况,藻体碳水化合物、蛋白质、叶绿素等多种生化组成含量均为最高,因此每个细胞的干质量最大(10.52 $\text{ng}/\text{个}$),为氮磷摩尔比 64 时的 1.59 倍。

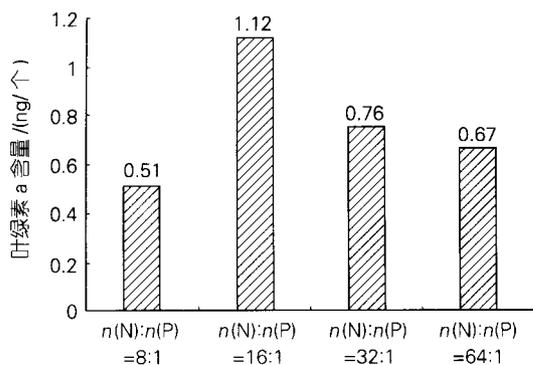


图4 氮磷比对叶绿素 a 含量的影响

Fig.4 Effect of n(N): n(P) on chl.a

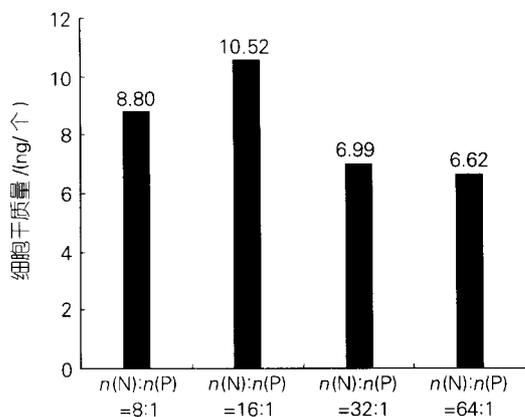


图5 氮磷比对细胞干质量的影响

Fig.5 Effect of n(N):n(P) on the dry weight of cell

3 结论

高营养盐水平条件下氮浓度及氮磷摩尔比的变动对海洋浮游植物生化组成、细胞形态、细胞生命力、表面吸附力影响显著,从而影响其对微量金属的吸收与吸附。当氮磷摩尔比为 16 时,蛋白质与碳水化合物之比 (P/C) 为最大值,藻细胞干质量、碳水化合物、蛋白质及叶绿素含量最大,微氏海链藻生长状况最佳,生命力最强,藻体吸收微量金属能力较好;氮磷摩尔比偏离 Redfield 比值,微氏海链藻生长受抑制,各生化组成含量下降。但氮磷摩尔比对藻表面积、细胞壁碱性活性功能团含量的影响与之不同,氮磷摩尔

比越低,藻表面积越大,碱性功能团含量越高,吸附营养盐、微量金属能力提高。营养盐水平变动对微氏海链藻吸附、吸收金属能力影响不一。

参考文献:

- [1] 国家海洋局. 2001~2005 年中国海洋环境质量公报[EB/OL].<http://www.soa.gov.cn/hygb/index.html>,2005-01-10.
- [2] 陈尚,朱明远,马艳,等.富营养化对海洋生态系统的影响及其围隔实验研究[J].地球科学进展,1999,14(6): 571-576.
- [3] Wang W X, Robert C H D. Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P and Si) [J].*Wat Res*, 2001, 35(1): 315-321.
- [4] 李文权,蔡阿根,王宪,等.光和营养盐对三角褐指藻生化组成的影响[J].中国环境科学,1994,14(3): 185-189.
- [5] 李铁,胡立阁,史致丽.营养盐对中肋骨条藻和新月菱形藻生长及氮磷组成的影响[J].海洋与湖沼,2000,31(1): 46-50.
- [6] 王大志,黄世玉,程兆第.营养盐水平对四种海洋浮游硅藻胞外多糖产量的影响[J].台湾海峡,2003,22(4): 487-492.
- [7] Penna A, Berluti S, Penna N. Influence of nutrient ratios on the vitro extracellular polysaccharide production by marine diatoms from the Adriatic Sea[J]. *J Plankton Res*, 1999, 21(9):1 681-1 690.
- [8] 朱明,张学成,茅云翔,等.温度、盐度及光照强度对海链藻 (*Thalassiosira* sp.)生长的影响[J].海洋科学,2003, 27(12):58-61.
- [9] Parson T R. A manual of chemical and biological methods for sea water analysis[M]. Oxford: Pergamon Press, 1984.
- [10] Dubios H, Gilles R S. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, 28: 250-254.
- [11] 李建武,肖能庚,余瑞元.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社, 1998.
- [12] Garden-Torresdey J L, Becker-Hapak M K, Darnall D W, et al. Effect of chemical modification of algal carboxyl groups on metal ion binding[J]. *Environ Sci Technol*, 1990, 24(9):1 372-1 378.
- [13] Melchor G D. The role of phytoplankton cells on the control of heavy metal concentration in seawater[J].*Mar Chem*, 1995, 48:215-236.

- [14] Li S X, Qian S H, Huang G Q, *et al.* Separation and preconcentration of Se(IV)/Se(VI) speciation on algae and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry in sediment and water [J]. *Fresenius Z Anal Chem*, 1999, **365**(5):469–471.

Effects of nitrate and phosphate on the biochemical composition of *Thalassiosira weissflogii*

LI Shun-xing¹, ZHENG Feng-ying², HONG Hua-sheng¹, HUANG Bang-Qin¹, WANG Da-zhi¹, LIN Hui-qin², LIN Ling²

(1. State Key Lab for Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Chemistry, Zhangzhou Teachers College, Zhangzhou 363000, China)

Received: Jan., 20, 2005

Key words: nutrients; biochemical composition; nutriology; marine phytoplankton; *Thalassiosira weissflogii*

Abstract: *Thalassiosira weissflogii* was cultured in high levels of nutrients, and the influence of different levels of two macro-nutrients, nitrate and phosphate on biochemical composition, including the contents of carbohydrate, protein, chlorophyll, basic function group, cell dry weight and cell shape was investigated to assess the bioactivity, surface adsorption capability, i.e., the metal uptake/adsorption ability by *T. weissflogii*. When the ratio of nitrate to phosphate [$n(N):n(P)$] is 16, the contents of chlorophyll, carbohydrate, and protein were the highest, its growth level and bioactivity were the best, and its ability to absorb the trace element were also outstanding. But the quantity of basic function group in cellular wall and cell size was the highest when $n(N):n(P)$ is 8, the lowest when $n(N):n(P)$ is 64. So, the ability for bio-absorption trace element is good when $n(N):n(P)$ is 8, and poor when $n(N):n(P)$ is 64. So, the influences of $n(N):n(P)$ on the metal uptake and adsorption were quite different.

(本文编辑:张培新)