

亚铁离子对赤潮异弯藻种群消长和部分生化特性的影响

周成旭, 严小军, 陈安敏

(宁波大学 海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 研究了赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*) 在不同浓度的 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fe1) 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe2) (浓度分别为: 高铁 150 nmol/L、低铁 50 nmol/L, 缺铁 0 nmol/L Fe0) 中的种群消长过程、单位细胞总多糖特征、光合色素 *chl*a、*chl*c 变化以及 NO_3^- -N 的吸收情况。结果表明, Fe^{2+} 浓度影响到赤潮异弯藻的消亡: 缺铁组比高铁组种群消亡慢。在平台期和衰亡期时, Fe1 各组单位细胞总多糖含量均明显高于 Fe2 各组。从平台期到衰亡期, 各组单位细胞多糖含量明显增加, Fe2 各组增量最大, Fe1 各组多糖倍增与 Fe0 相似。亚铁离子浓度的进一步增加有利于单位细胞色素 *chl*a 和 *chl*c 的积累。亚铁离子的不同化合物状态影响到多糖和光合色素的累积, 但不影响种群生长率和对 NO_3^- -N 的吸收。

关键词: 亚铁离子; 赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*); 种群消长; 多糖; 光合色素

中图分类号: Q89

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)01-0010-04

赤潮在沿海区域频繁发生与复杂的陆源物质有明显的相关性, 环境关键物质如何通过影响赤潮生物生理生化特性而影响其毒性特征及机理的相互关系是研究和防治赤潮这一海洋灾害的重要环节。赤潮异弯藻是在世界范围内广泛发生的^[1-3] 具有典型鱼毒性^[4] 并对其他海洋生物造成危害的一种重要赤潮生物^[5], 由于对该种赤潮的毒性特征、毒害机理、致害程度等的报道存在明显的地域性差异^[6], 使得相关研究尚存空白有待定论^[7,8]。

铁离子被认为是海洋浮游植物生长的重要限制因子^[9]。在现代氧化的海洋环境中, 亚铁离子长期以来被认为是可以忽略的一个因子, 但由于陆源污染物的复杂与多变特性, 研究者开始意识到 Fe^{2+} 在沿海区域对赤潮发生及危害机理方面的重要意义^[10]。本实验研究了一株赤潮异弯藻在 Fe^{2+} 两种化合物及不同初始浓度水平下种群的消长特征、单位细胞 *chl*a、*chl*c 和总多糖特性以及水体中 NO_3^- -N 的吸收状况, 目的在于探讨 Fe^{2+} 对赤潮异弯藻种群消长的影响以及部分生理生化特性的相应变化, 为进一步研究其毒性机理和防治赤潮研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 藻种

从浙江象山南田塘赤潮水中分离纯化的一株赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*), 离心收集浓缩藻液, 利用 Harrison 等^[11] 的 ESAW 广适性人工海水配方, 配制缺铁的 ESAW 广适性人工海水, 将浓缩藻液于其中进行铁饥饿培养 7 d 后, 重新离心浓缩

用于实验。

1.2 培养方法

实验容器为 250 mL 三角烧瓶, 经盐酸浸泡后超纯水冲洗并经干热消毒, 全部实验均使用 ESAW 人工海水。以 NaCl 调节盐度至 30。培养液高压灭菌后加维生素。

两种铁化合物分别为 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (记为 Fe1) 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (记为 Fe2), 分别作为水体中的唯一铁源。铁离子浓度分别为高铁 (H) 150 nmol/L、低铁 (L) 50 nmol/L, 以缺铁的 ESAW 将铁饥饿浓缩藻种再悬浮作为缺铁组 0 nmol/L (记为 Fe0), 各组编号为: Fe1H, Fe1L, Fe2H, Fe2L, Fe0。每组设置两个平行样。

各组等量加入浓缩饥饿藻液, 初始藻密度约为 5×10^4 个/mL, 水体总体积 230 mL, 于 27°C、光暗周期 L:D 为 12 h: 12 h、光照强度为 3 500 lx 的 GX2 型智能光照培养箱中培养。

1.3 测定方法

以血球计数板每天测试细胞密度。

实验初期、平台期及衰亡期各取两个 20 mL 藻液抽滤, 分别测定所得藻细胞的 *chl*a、*chl*c 和多糖,

收稿日期: 2006-04-20; 修回日期: 2006-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20472040); 教育部高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目 (705028); 浙江省自然科学基金资助项目 (Y504083)

作者简介: 周成旭 (1968-), 女, 四川什邡人, 副研究员, 主要从事浮游植物的生理生态和赤潮研究, E-mail: zhouchengxu@nbu.edu.cn

滤液用于 NO_3^- -N 含量的测定。

以硫酸苯酚法^[12]测定细胞总多糖。以丙酮萃取法测定 chl_a、chl_c^[13]。以所测值除以对应细胞数作为单位细胞的量值。

采用 $\mu\text{MAC-1000}$ 便携式水质自动分析仪测定 NO_3^- -N 含量。

2 结果与讨论

2.1 Fe^{2+} 对种群消亡的影响

经铁饥饿的赤潮异弯藻在新接种的各组中都有明显的种群生长, 增殖过程类似的原因应该是因浓

缩藻液本底铁离子含量已经满足藻类生长对铁离子的要求。值得注意的是, 种群的消亡过程与初始 Fe^{2+} 浓度的相关性: 相对两个高铁组 (Fe₂H 和 Fe₁H) 而言, 缺铁组消亡较为缓慢, 能较长时间地维持较高种群密度; 低铁组 Fe₂L 和 Fe₁L 消亡存在差异, Fe₁L 的消亡最快, Fe₂L 的消亡最慢(图 1)。消亡速率的差异与藻体内的相关生理生化过程是密切相关的, 缺铁组消亡比高铁组缓慢, 显示了亚铁离子相对缺乏的环境较有利于赤潮异弯藻种群的维持, 而不同化合物状态之间的差异则与细胞获得亚铁离子的能力和相关代谢有关。

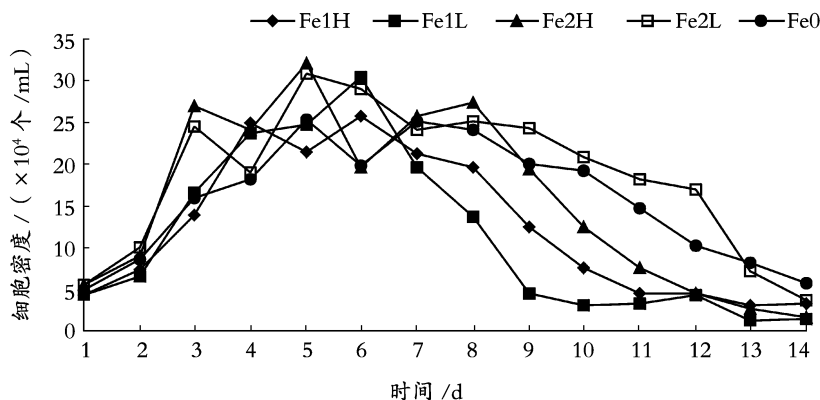


图 1 不同 Fe^{2+} 状态下赤潮异弯藻的种群消长

Fig. 1 The population growth of *H. akashiwo* treated with different ferrous ions

Fe₁H: $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}] = 150 \text{ nmol/L}$, Fe₁L: $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}] = 50 \text{ nmol/L}$,

Fe₂H: $[\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}] = 150 \text{ nmol/L}$, Fe₂L: $[\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}] = 50 \text{ nmol/L}$, Fe₀: $[\text{Fe}^{2+}] = 0 \text{ nmol/L}$

2.2 种群消亡中单位细胞总多糖的变化特征

平台期(第 5 天)和衰亡期(第 14 天)单位细胞总多糖含量与铁离子的化合物类别有显著的相关性 ($P < 0.05$)。由表 1 中可以看出, 平台期和衰亡期时, Fe₁H、Fe₁L 多糖含量高于 Fe₂H、Fe₂L 1~2 个数量级; 从平台期到衰亡期, 各组多糖含量均表现出增加的特性, 其中 Fe₂ 的两个浓度组多糖倍增显著大于 Fe₁ 和 Fe₀ 各组, 显示出 Fe^{2+} 化合物类别对细胞体内多糖累积的影响。

铁离子化合物在水中的存在形式关系到赤潮生物对铁离子的可利用能力^[14], 更关系到其中的生理生化代谢产物, 近期研究表明, 水体中铁限制的解除有利于硅藻细胞体内的多糖累积^[15]。在尚存在争议的有关赤潮异弯藻的毒性研究中, 一个观点认为赤潮异弯藻的毒性源于其细胞高含量的多糖类物质^[5, 16, 17]。从作者的实验结果发现, 在平台期和衰亡期中, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 高铁与低铁组细胞的多糖累积都比 FeSO_4 高铁与低铁组中的多糖累积

表 1 不同 Fe^{2+} 状态下赤潮异弯藻生长平台期和衰亡期单位细胞多糖含量及倍增量

Tab. 1 The contents and changes of cellular polysaccharide in *H. akashiwo* at stationary and crash phases affected by different ferrous ions and their concentrations

组别	多糖含量 ($\times 10^{-4} \mu\text{g}/\text{个}$)		多糖倍增量
	平台期	衰亡期	
Fe ₁ H	0.49	1.12	2.3
Fe ₁ L	1.60	2.39	1.5
Fe ₂ H	0.08	0.84	10.4
Fe ₂ L	0.07	0.25	3.8
Fe ₀	0.20	0.43	2.2

量高; 从平台期到衰亡期, 各组都显示出单位细胞多糖含量增加, 而且 FeSO_4 各组中的多糖增量显著大, 显示出两种铁离子化合物影响细胞多糖累积的差异。这种特征在以多糖为致毒原因的赤潮异弯藻赤

潮时就构成了一个因为环境关键物质影响生理代谢从而影响毒害特征的关系;而在种群消亡过程中,高密度维持的时间长短和多糖的增加又关系到该过程的毒害机理和毒性大小。

2.3 种群增殖中单位细胞色素的变化特征

亚铁离子对光合色素的影响在种群增殖过程中表现突出。从指数期(第3天)到平台期(第5天)单位细胞 *chl a* 和 *chl c* 累积来看(表 2、3),铁的缺乏明显限制细胞光合色素的增加。Fe0 组中 *chl a* 的增量为 0, *chl c* 的增量也小于 Fe1H、Fe1L、Fe2H 各组 1 个数量级。类似的研究也发现在解除铁限制的情况下,赤潮异弯藻的光谱特性发生变化,光合色素含量会明显增加^[18]。

表 2 不同 Fe²⁺ 状态下赤潮异弯藻种群增殖中单位细胞 *chl a* 的含量变化

Tab. 2 The changes of chlorophyll a in *H. akashiwo* affected by different ferrous ions

组别	细胞 <i>chl a</i> 含量		色素增量
	10 ⁻⁴ μg/个		
	指数期	平台期	
Fe1H	0.021	0.047	0.026
Fe1L	0.019	0.041	0.022
Fe2H	0.017	0.038	0.021
Fe2L	0.030	0.037	0.007
Fe0	0.017	0.017	0.000

表 3 不同 Fe²⁺ 状态下赤潮异弯藻种群增殖中单位细胞 *chl c* 的含量变化

Tab. 3 The changes of chlorophyll c in *H. akashiwo* affected by different ferrous ions

组别	细胞 <i>chl c</i> 含量		色素增量
	10 ⁻⁴ μg/个		
	指数期	平台期	
Fe1H	0.033	0.052	0.019
Fe1L	0.020	0.100	0.080
Fe2H	0.000	0.022	0.022
Fe2L	0.049	0.051	0.002
Fe0	0.014	0.020	0.006

2 种亚铁化合物的高铁状态下,光合色素增量相似,Fe1H 和 Fe2H 色素增量位于同样数量级;低铁状态的 Fe1L 和 Fe2L 的 *chl a* 和 *chl c* 增量则有显著差异,Fe2L 组 *chl a* 增量小于 Fe1L 两个数量级,同样,Fe2L 组中 *chl c* 的增量也明显低于 Fe1L(表 3),说明 Fe1 对细胞光合色素的累积更为有利,显示了亚铁离子的不同化合物状态影响到细胞色素的积累。

2.4 水体中 NO₃⁻-N 变化特征

各实验组水体中 NO₃⁻-N 消耗有相似的趋势,在 2 种二价铁的高铁、低铁和缺铁水平下,水体中 NO₃⁻-N 的变化相近(图 2),其吸收率与铁离子浓度和化合物种类没有显著相关性(P> 0.05)。说明实验设置状态下的亚铁离子浓度及化合物差异不影响 NO₃⁻-N 的吸收过程。

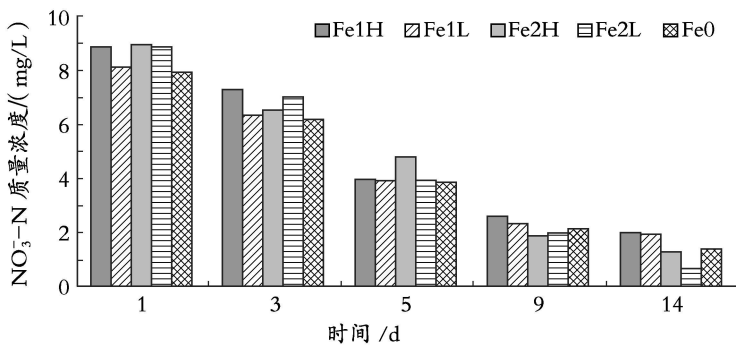


图 2 不同 Fe²⁺ 状态下赤潮异弯藻种群消长过程中 NO₃⁻-N 的变化

Fig. 2 The changes of nitrate N in *H. akashiwo* culture medium affected by different ferrous ions

Fe1H: [Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O] = 150 nmol/L, Fe1L: [Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O] = 50 nmol/L,

Fe2H: [FeSO₄ · 7H₂O] = 150 nmol/L, Fe2L: [FeSO₄ · 7H₂O] = 50 nmol/L, Fe0: [Fe²⁺] = 0 nmol/L

3 结论

实验结果显示,亚铁离子浓度满足种群增殖需

要时,浓度的进一步增加和化合物的不同存在形式对种群的增殖过程没有显著的影响,亚铁离子浓度的进一步增加不影响其种群生长率。但是 Fe²⁺ 浓度

和化合物存在形式影响到赤潮异弯藻的消亡, 缺铁组比高铁组种群消亡慢, 初始 FeSO_4 低浓度能维持消亡过程中相对长时间的高密度状态。

在平台期和衰亡期时, 单位细胞总多糖含量 Fe_1 各组均明显高于 Fe_2 各组。从平台期到衰亡期, 单位细胞多糖含量明显增加, Fe_2 各组增量最大, Fe_1 各组多糖倍增与 Fe_0 相似。显示亚铁离子的化合物存在形式影响到细胞多糖的累积。

研究表明, 亚铁离子浓度的进一步增加有利于单位细胞色素 chl_a 和 chl_c 的积累。高浓度状态的 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与 FeSO_4 组对细胞色素增量的作用相似, 低浓度 FeSO_4 组中 chl_a 和 chl_c 增量明显低于 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的, 说明后者更有利于色素的累积。

亚铁离子的不同化合物状态影响到细胞多糖和光合色素的累积, 但不影响种群生长率和对 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的吸收。

不同二价铁离子的浓度和化合物存在形式影响到赤潮异弯藻赤潮的维持时间、生理生化过程从而构成特征毒害机理。

致谢: 感谢骆其君副教授和徐志标同学野外采样。

参考文献:

- [1] 郭玉洁. 大连湾的赤潮生物[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(2): 211-215.
- [2] Han M S, Kim Y P, Cattolico R A. *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) resting cell formation in batch culture: strain identity versus physiological response? [J]. **Journal of Phycology**, 2002, 38(2): 304-317.
- [3] Itakura S, Nagasaki K, Yamaguchi M, *et al.* Cyst formation in the red flagellate *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) [J]. **J Plankton Res**, 1996, 18: 1975-1979.
- [4] Khan S, Arakawa O, Onoue Y. Neurotoxins in a toxic red tide of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) in Kagoshima Bay, Japan [J]. **Aquaculture Research**, 1997, 28(1): 9-17.
- [5] Smayda T J. Ecophysiology and bloom dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) [A]. Anderson D M, Cembella A D, Hallegraeff G M. Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms [C], Germany: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1998. 135-148.

- [6] Ono K, Khan S, Onoue Y. Effects of temperature and light intensity on the growth and toxicity of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) [J]. **Aquaculture Research**, 2000, 31(5): 427-442.
- [7] Twiner M J, Dixon S J, Trick C G. Toxic effects of *Heterosigma akashiwo* do not appear to be mediated by hydrogen peroxide [J]. **Limnol Oceanogr**, 2001, 46(6): 1400-1405.
- [8] 颜天, 周明江, 傅萌, 等. 赤潮异弯藻毒性及毒性来源的初步分析[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(1): 50-55.
- [9] Martin J H, Fitzwater S E. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the northeast Pacific subarctic [J]. **Nature**, 1988, 331: 341-343.
- [10] de Baar H J W, de Jong J T M, Loscher B M, *et al.* Importance of iron for plankton blooms and carbon dioxide draw down in the Southern Ocean [J]. **Nature**, 1995, 373: 412-415.
- [11] Harrison P J, Waters R, Taylor F J R. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton [J]. **J Phycol**, 1980, 16: 28-35.
- [12] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 11-12.
- [13] Jeffrey S W, Humphrey G F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton [J]. **Biochem Physiol Pflanzen**, 1975, 167(2): 191-194.
- [14] Wells M L. The level of iron enrichment required to initiate diatom blooms in HNLC waters [J]. **Marine Chemistry**, 2003, 82(1-2): 101-114.
- [15] van Oijen T, Veldhuis M J W, Gorbunov M Y, *et al.* Enhanced carbohydrate production by Southern Ocean phytoplankton in response to in situ iron fertilization [J]. **Marine chemistry**, 2005, 93(1): 33-52.
- [16] Nakamura A, Okamoto T, Komatsu N, *et al.* Fish mucus stimulates the generation of superoxide anion by *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo* [J]. **Fish Sci**, 1998, 64: 866-869.
- [17] Oda T, Okamoto T, Ishimatsu A, *et al.* Lectin induced enhancement of superoxide anion production by a red tide phytoplankton [J]. **Mar Biol**, 1998, 131: 383-390.
- [18] 李东侠, 丛威, 蔡昭铃, 等. 赤潮异弯藻在铁限制下的光谱特性 [J]. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1181-1184.

(下转第 18 页)

Population dynamics and some biochemical changes in *Heterosigma akashiwo* affected by ferrous ion

ZHOU Cheng-xu, YAN Xiao-jun, CHEN An-min

(Marine Biotechnology Key Laboratory, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Received: Apr., 20, 2006

Key words: Ferrous ion; *Heterosigma akashiwo*; population dynamics; polysaccharides; chlorophylls

Abstract: The effects of ferrous ion on ichthyotoxic red tide organism *Heterosigma akashiwo* were studied. Two ferrous ion forms, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ (Fe1) and FeSO_4 (Fe2), were added to the culture under three different concentrations (high group, 150 nmol/L; low group, 50 nmol/L, naught group, 0 nmol/L), changes of population, polysaccharide, chlorophyll a and c and nitrate level in culture medium were investigated. The results indicated that ferrous concentration affects the population crash, a ferrous deficient group (Fe0) can maintain a longer life and a higher density than the higher iron groups during the population crash. The cellular polysaccharide content in Fe1 group is significantly higher than that in Fe2 group both at stationary phase and crash phase. From stationary phase to crash phase, the polysaccharide content in each group increased, the highest increase appeared in Fe2. Increase of ferrous ion is helpful to the accumulation of chlorophylls. The different formations of ferrous ion affect the accumulations of polysaccharide and chlorophylls but have no obvious effects on the population growth rate and nitrate level.

(本文编辑: 张培新)