

小角刺藻生长过程中溶解游离氨基酸 含量在海水中的变化^{*}

陆田生 纪明侯

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于1986年12月—1987年2月在温度为 $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养小角刺藻, 以HPLC法测定该藻在培养过程中海水的溶解游离氨基酸(DFAA)含量变化。结果表明, 小角刺藻不仅是海水中DFAA的主要生产者, 而且也是DFAA的消耗者。小角刺藻不仅在缺乏硝酸盐的时候要吸收DFAA, 即使在硝酸盐充足的情况下也会吸收。在小角刺藻的生长初期, 水体中DFAA的含量迅速降低, 而在后期却又大大增高。在小角刺藻的不同生长阶段, 水体中DFAA的组成也不同。这些都可以说明海洋中DFAA的含量、组成和地区分布是密切地同浮游植物群落的繁殖消亡过程相关联的。

关键词 小角刺藻 溶解游离氨基酸 溶解碳水化合物 溶解有机碳

DFAA在海洋微生物生长过程中起着重要作用。通常人们认为浮游植物是其主要生产者, 而细菌则是主要消耗者。一些研究表明, 浮游植物同样能消耗DFAA(Flynn et al., 1986; Admiraal et al., 1986)。Hammer等(1981)在海上使用大塑料围隔袋(容量为 $3-4\text{ m}^3$, 袋深为 $4-5\text{ m}$), 接种一种硅藻圆海链藻(*Thalassiosira rotula*), 于近似于现场条件下观察浮游植物在繁殖过程中DFAA含量的变化。Admiraal等(1984, 1986)和Poulet等(1983)则在实验室培养条件下研究了几种硅藻繁殖过程中水体中DFAA的变化状况。本研究在实验室条件下培养小角刺藻, 以观察水体中DFAA的来源及其含量变化特点。

1 材料和方法

1.1 藻种的来源与培养

海洋浮游植物——小角刺藻(*Chaetoceros minutissimus* Maker et Pr-Lavr)藻种系由中国科学院海洋研究所单胞藻饵料组提供。小角刺藻的培养方法参照曹文达等(1984)¹⁾。在装有3L经Whatman GF/C滤膜过滤并经煮沸灭菌后的海水的锥形瓶中, 接种小角刺藻(起始接种量约为 $5\times 10^5\text{ cell/ml}$), 在日光灯照度为 $1700-2000\text{ lx}$, 光

^{*} 国家自然科学基金资助项目, 3870137号。陆田生, 男, 出生于1954年9月, 副研究员。

在小角刺藻培养过程中, 得到了曹文达研究员的帮助, 王玉君、李烈英两同志在反相HPLC分析给予热情帮助, 沈志良同志协助无机氮盐的分析, 谨志谢忱。

收稿日期: 1993年9月1日, 接受日期: 1996年4月13日。

1) 曹文达等, 1984, 全国第三次腐植酸化学学术讨论会论文集, 132—137。

暗周期为 12h:12h, 温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的培养箱中静置培养。每天摇动锥形瓶数次。在培养过程中, 每 1—2d 用 XB-K-25 型血球计板在显微镜下计算细胞数。在 18d 培养过程中, 每隔 0.5—2d 取培养液用 GF/C 滤膜过滤, 滤液装于聚乙烯瓶中, 立即放入 -20°C 低温冰箱中保存, 用以分析 DFAA 等项目。

1.2 化学分析与测定方法

1.2.1 DFAA 的分析

采用 Lindroth 等(1979)提出, 并经王玉君等(1989)改进的方法, 将样品中氨基酸柱前衍生生成邻苯二甲醛的荧光衍生物, 用反相 HPLC 方法分析。所用仪器为 Waters 公司 AAA 系统液相色谱仪。色谱柱为 $125 \times 4\text{mm}$ 的 $3\mu\text{C}-18$ 柱(大连色谱技术开发公司)。所用氨基酸标准为 Sigma 公司和日本和光化学公司产品。分析方法偏差为 10% 左右。

1.2.2 溶解有机碳(DOC)、溶解碳水化合物(DCHO)及 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 含量的测定

按照杨鹤鸣等(1984)改进的“湿式氧化法”测定样品生成的 CO_2 量, 并计算 DOC 含量。采用纪明侯等(1983)改进后的“苯酚—硫酸法”测定 DCHO 的含量。用 Technicon AA II 型自动分析仪测定 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的含量。

2 结果

小角刺藻在培养过程中的生长状况见图 1。即前 5d 是指数生长期, 其后为稳定生长期和衰老期。小角刺藻生长过程中海水中 TDFAA(总溶解游离氨基酸), DCHO 和 DOC 含量的变化情况, 见图 2。从图 2 可以看出, 在小角刺藻的生长初期, 水体中的 TDFAA 含量降低很快, 培养 1d 就从 $2.536\mu\text{mol/L}$ 降到最低值 $0.647\mu\text{mol/L}$ 。然后逐渐上升, 到指数生长后期, 又恢复到起始的水平。在稳定生长期内, TDFAA 的浓度变化不大, 但到后期(或称衰老期)TDFAA 的浓度迅速增加, 达到起始浓度的约 2 倍。

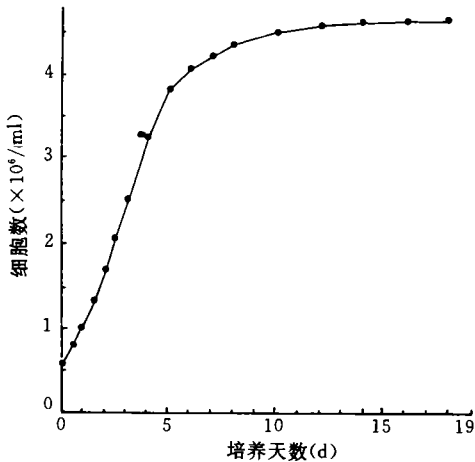


图 1 小角刺藻在海水培养过程中的生长状况
Fig.1 Growth pattern of *Chaetoceros minutissimus* cultured in seawater

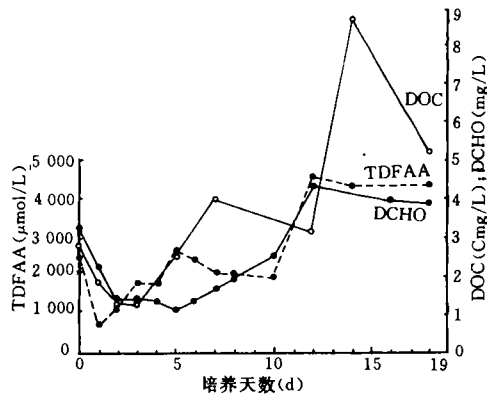


图 2 小角刺藻在培养过程中海水中 TDFAA, DOC 和 DCHO 的含量变化
Fig.2 Change of TDFAA, DOC and DCHO concentrations in seawater during the culture of *Chaetoceros minutissimus*

这一变化规律与 Poulet 等 (1983) 对于柔弱角刺藻 (*Chaetoceros debile*) 的培养结果基本相似。另外, 图 2 还表明, DOC 和 DCHO 含量的变化与 TDFAA 的变化基本一致: 开始时浓度降低, 到生长后期达最高值; 但 DOC 浓度到最后还出现下降的趋势。

小角刺藻在培养过程中海水中各单个 DFAA 含量的变化见图 3。可看出, 大部分 DFAA 含量的变化趋势与 TDFAA 含量的变化(图 2)相似, 即在指数生长初期, DFAA 含量很快降低, 到生长后期又升高。但不同的氨基酸有其不同的变化特点。在整个培养过程中, Thr, Val, Phe, Leu 等氨基酸含量总是很少, 甚至检测不出; Ile, Tyr, Met, Asn 等含量也较低(图 3a, b)。His, Orn 在前期的含量较低, 但到后期却有明显的增高(图 3c)。大量存在的氨基酸有 Ser, Gly, Ala, Asp, Glu; 其次是 Arg 和 Glu。在指数生长期增加最快的是 Glu 和 Gln(图 3b), 它们也是这个时期水体中含量最丰富的氨基酸。在生长后期或衰老期, Ser, Gly 和 Ala 增加最快(图 3d), 且成为水体中含量最丰富的氨基酸。Arg 含量在整个培养过程中一直较高, 只是在稳定生长阶段内曾一度下降(图 3c)。

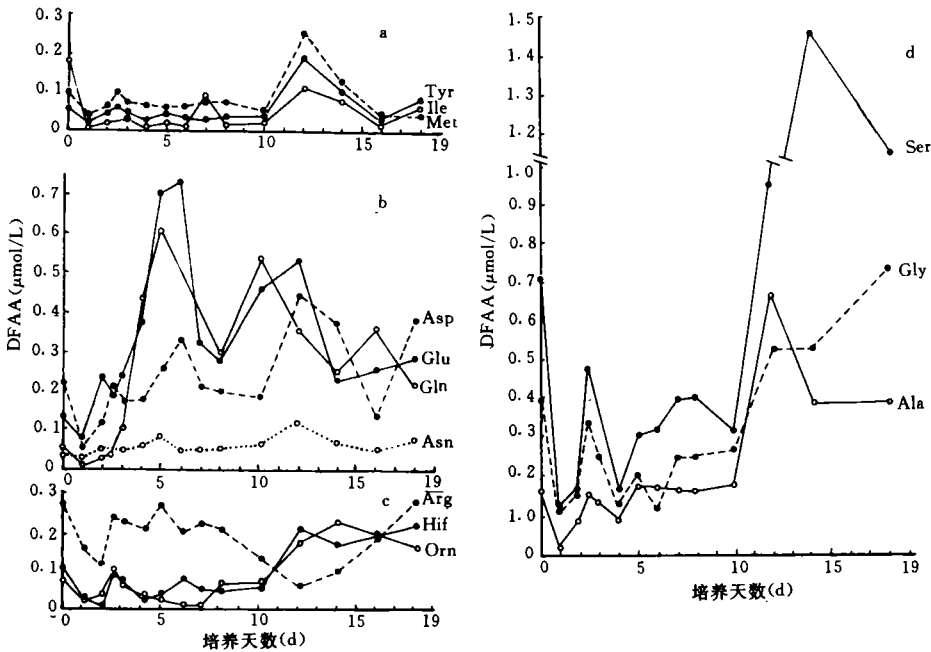


图 3 小角刺藻在培养过程中海水中的各种 DFAA 的含量变化

Fig.3 Change of amino acids contents in seawater during the culture of *Chaetoceros minutissimus*

a. Tyr, Ile and Met; b. Asp, Glu, Asn and Gln; c. Arg, His and Orn; d. Ser, Gly and Ala.

图 4 表明, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 含量在小角刺藻指数生长期降低很快, 第 5 d 即降到最低水平, 其后无大变化; 而 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 含量在 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 降低过程中则迅速增加, 到第 5, 6 d 达最高值, 然后又迅速降低到水体中的起始浓度, 不再变化。

3 讨论

从上述结果可以看出, 浮游植物的吸收和释放作用对于 DFAA 在海水中的浓度变

起着重要的作用。浮游植物不仅在“硝酸盐饥饿”的情况下要吸收 DFAA, 而且在硝酸盐充足的时候也要吸收 DFAA。实验表明, 小角刺藻在指数生长的最初阶段, 一天就把水体中 DFAA 的含量降到最低限度, 吸收速率约为 $2\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 而在该阶段硝酸盐是充足的。由此可见, DFAA 与无机氮同样重要, 可作为氮源为浮游植物所利用。Admiraal 等(1984)也发现在硝酸盐充足的情况下, 一种茧形藻 (*Amphiprora cf. paludosa*) 和盐生舟形藻 (*Navicula salinarum*) 同样也吸收 DFAA。

在指数生长后期, DFAA 的浓度又提高到与起始差不多的水平。这是因为在这阶段 DFAA 的释放量大于被吸收的量。Poulet 等(1983)在柔弱角刺藻的培养中也观察到这一现象。他们曾测定这种硅藻的化学组成, 发现在指数生长初期, 藻体本身的蛋白质含量较低, 因而对 DFAA 的吸收较快; 而到指数生长的后期, 藻体本身的蛋白质含量增加到原来的 10—20 倍, 故此时对水体中的 DFAA 吸收就降低而放出相当量的 DFAA, 使水体中 DFAA 含量提高。Hammer 等(1981)发现在圆海链藻的指数生长期, 水体中的 DFAA 增加。本工作所得结果与上述一致。在稳定生长期有一段时间里, 水体中 DFAA 的含量变化不大(图 2), 这是因为此时水体中硝酸盐差不多已消耗尽(图 4), 而 DFAA 成为小角刺藻的主要氮源, 故吸收速率增大, 同时一部分藻体细胞已开始死亡, 它们向水中释放 DFAA 的速率也增加, 这时处于一种动态平衡状态, 因而水中 DFAA 的浓度变化不明显。当小角刺藻生长到后期, 水体中 DFAA 含量迅速增高(图 2), 这是因为浮游植物的生长活动已经减慢, 大量藻体开始衰老死亡, 向水中释放出大量溶解有机物。这种现象与 Hammer 等(1981)和 Poulet 等(1983)所报道的结果相符合。

在小角刺藻的生长过程中, 水体中溶解碳水化合物(DCHO)的含量变化基本上与 DFAA 相类似: 在开始时浮游植物对于 DCHO 的吸收要大于释放量, 其后随着浮游植物的大量繁殖, 释放的碳水化合物增加, 至生长后期达最高值(图 2)。Ittekkot(1982)在研究北海北部春季浮游植物繁殖过程中溶解有机物质的变化时, 发现释放出的 DCHO 和 DFAA 占 DOC 的 20%, 这个量是相当可观的。对 TDFAA 和 DCHO 的变化进行比较(图 2), 可以看出, TDFAA 的变化更要复杂一些, 这可能是 TDFAA 比 DCHO 对生物体更为敏感, 因为 TDFAA 可直接构成生物的机体, 而且还可以作为细胞内的缓冲物质以适应外界条件的变化, 如 Dortch (1982)曾描述过, 海洋硅藻能改变细胞内的氮贮量(硝酸盐、铵、氨基酸、蛋白质等)以适应不同的外界条件。在小角刺藻培养的后

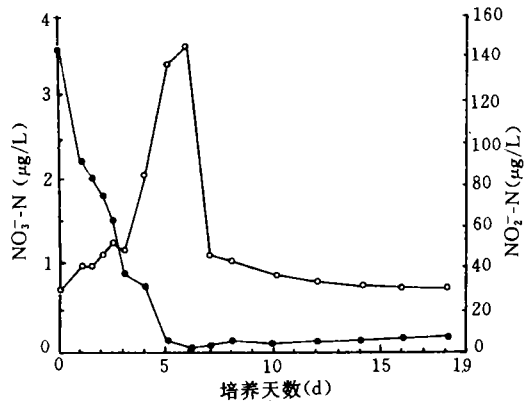


图 4 小角刺藻生长过程中海水中 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ (●) 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ (○) 含量的变化

Fig.4 Change of contents of $\text{NO}_3^- - \text{N}$ (●) and $\text{NO}_2^- - \text{N}$ (○) in seawater during the culture of *Chaetoceros minutissimus*

期, DOC 含量增至最高值后又开始下降, 这可能是因为溶解有机物(DOM)产生凝聚而转变成颗粒有机物(POM)的缘故。

从图 4 可看出, NO_3^- 与 NO_2^- 通过小角刺藻的作用会产生一个平衡。如 NO_3^- 含量很高时, 浮游植物会通过吸收它, 还原成 NO_2^- 排出; 当 NO_3^- 含量很低时, 浮游植物又开始吸收 NO_2^- 作为氮源。

图 2 和图 3 结果还表明一个有意义的特征: 各个氨基酸的相对含量是与培养的时间相关的, 几乎大部分的氨基酸都参与了吸收与释放过程。在生长的前期, Glu 和 Gln 增加较快, 成为水体中最占优势的氨基酸; 而到后期, Ser, Gly 和 Ala 的贡献最大。水体中这种相对组成的变化可能体现了硅藻的不同生理要求(Poulet et al., 1983)。例如, 生长后期, 水体中碱性氨基酸 Orn, His 含量的增加就可能是由于衰老细胞的分解伴随着蛋白质的水解或变质的结果(Poulet et al., 1983)。另外, Arg 含量降低时, Orn 的含量增加, 这可能是 Arg 代谢后的结果(Mopper, 1982)。图 3 表明, Ser, Gly, Ala, Glu, Asp, Gln 和 Arg 为含量比较丰富、变化比较大的氨基酸。Poulet 等(1983)在培养柔弱角刺藻中发现 Asp, Ser, His, Thr, Ala, Leu, Orn 等为含量较丰富而且变化较大的氨基酸, 本工作结果与之不全相同。Hammer 等(1981)在培养圆海链藻的实验中, 证实 Ala, Gly, Gln, Ser 等为占优势的氨基酸, 而变化较大的是 Glu, Ala, Val, Leu, Orn 和 Lys, 本工作结果与之也有差异。这些差别的原因, 可认为是由于藻体培养条件和培养的硅藻种类不同, 因而它们的代谢产物也不同。纪明侯等(1985)对小角刺藻、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)和菱形藻(*Nitzschia* sp.) 3 种硅藻的水解氨基酸组成的研究表明, Glu, Asp, Ala, Gly, Arg, Phe, Leu 等为主要氨基酸; Hecky 等(1973)对 6 种硅藻的水解氨基酸分析结果是: Ser, Gly, Asp, Glu, Ala, Tyr, Thr, Leu 等为主要氨基酸。本工作结果与之有些近似。

4 结论

对小角刺藻的培养实验表明, 浮游植物不仅是海水中 DFAA 的主要生产者, 同时也是 DFAA 的消耗者。浮游植物不仅在硝酸盐缺乏的时候要吸收 DFAA, 而且在硝酸盐充足的情况下也会吸收它。在小角刺藻生长的初期, 水体中 DFAA 含量迅速降低, 而在后期却又大大增加。在小角刺藻的不同生长阶段 DFAA 的组成也不相同。这些都可以说明, 海洋中 DFAA 的含量、组成和分布的变异是与浮游植物的群落分布、繁殖死亡等过程有密切的关系。

参 考 文 献

- 王玉君等, 1989, 海洋科学, 2:43—47。
 纪明侯等, 1983, 海洋湖沼通报, 2:40—44。
 纪明侯等, 1985, 海洋学报, 75(5):598—604。
 杨鹤鸣等, 1984, 海洋科学, 1:27—30。
 Admiraal, W. et al., 1984, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 15:303—306。
 Admiraal, W. et al., 1986, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 98:241—253。
 Dortch, Q., 1982, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 61:243—264。
 Flynn, K. J. et al., 1986, *Mar. Biol.*, 90:159—163。
 Hammer, K. D. et al., 1981, *Mar. Chem.*, 10:533—544。

- Hecky, R. E. et al., 1973, *Mar. Biol.*, **19**:323—331.
Ittekkot, V., 1982, *Mar. Chem.*, **11**:143—158.
Lindroth, D. et al., 1979, *Anal. Chem.*, **51**:1667—1674.
Mopper, K., 1982, *Limnol. Oceanogr.*, **27**:336—347.
Poulet, S. A. et al., 1983, *Mar. Biol.*, **77**:93—100.

THE CHANGE OF CONTENTS OF DISSOLVED FREE AMINO ACIDS IN SEAWATER DURING THE GROWTH OF *CHAETOCEROS MINUTISSIMUS*

Lu Tiansheng, Ji Minghou

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071*)

Abstract The release and uptake of dissolved free amino acids(DFAA), determined by HPLC method, in culture at $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ of diatom *Chaetoceros minutissimus* Maker et Pr-Lavr were studied from Nov. 1986 to Feb. 1987. The results suggested that phytoplankton is not only a major producer of DFAA in seawater but also a consumer. Phytoplankton takes up DFAA as its nitrogen sources even though nitrate is sufficient in seawater. During the first stage of *Chaetoceros minutissimus* bloom, the concentrations of DFAA and DCHO declined, and at the end, both concentrations increased rapidly. The compositions of DFAA released in seawater were also found to be different according to the species of plankton and growth stages of the diatom. These facts indicate the composition, concentrations and distribution of DFAA are greatly influenced by the bloom and decline of communities of phytoplankton in seawater.

Key words *Chaetoceros minutissimus* Maker et Pr-Lavr Dissolved free amino acid (DFAA) Dissolved carbohydrate (DCHO) Dissolved organic carbon (DOC)