

铁限制条件下东海原甲藻分泌铁载体

王颜萍¹, 何 鹰², 郑晓玲^{2*}, 陈发荣², 李瑞香², Lee Frank S C², 王小如²

(1. 厦门大学 化学化工学院 现代分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005; 2. 国家海洋局 第一海洋研究所, 青岛 266061)

摘要:在铁限制条件下,进行东海原甲藻分泌铁载体的动态研究。对藻类在富铁与缺铁条件下生长状况、生长过程中分泌铁载体的情况以及海藻接种量对铁载体分泌的影响进行了连续观测,结果表明:东海原甲藻在缺铁条件下生长状况远不如在富铁条件下;随着藻类的生长,分泌铁载体不断增多,达指数生长期时,其分泌量也达到了最大值,之后藻类的生长和铁载体分泌都呈现下降趋势;高接种量东海原甲藻能分泌较多的铁载体,并在较短时间到达峰值。

关键词:铁载体;铁限制;CAS 实验;东海原甲藻

文章编号:1000-0933(2005)10-2788-04 **中图分类号:**Q178.1,Q946 **文献标识码:**A

Research on siderophore secreted by *Prorocentrum donghaiense* Lu under iron-limited conditions

WANG Yan-Ping¹, HE Ying², ZHENG Xiao-Ling^{2*}, CHEN Fa-Rong², LI Rui-Xiang², Lee Frank S. C², WANG Xiao-Ru² (1. *The Key Lab. of Modern Analytical Science of MOE, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005*; 2. *First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061*). *Acta Ecologica Sinica*. 2005, 25 (10): 2788~2791.

Abstract: Under iron-limited conditions, marine microorganisms are able to secrete low-molecular-weight, highly specific iron chelators termed siderophores. These compounds scavenge iron from protein complexes or insoluble hydroxides in the extracellular environment and transport it to the cell cytosol via a membrane-bound receptor protein in the microorganism. Iron is a necessary requirement in marine ecosystems. Therefore research on siderophores is very significant to interpretation of high nitrate low chlorophyll (HNLC) regions and iron hypothesis. However, it is not clear whether eukaryotic phytoplankton can produce the iron-specific chelating compounds.

Therefore, a systematic investigation was carried out for siderophore secreted by *P. donghaiense* Lu under iron-limited conditions. Parameters studied included the growth of the algae in iron-added and iron-deficient medium, the secretion of siderophore during algae growth, and the effect of algae population inoculated on the siderophore production. Results showed that the algae growth rate in iron-deficient medium was slower than those in iron-rich medium. Under iron-limited conditions, the siderophore production increased along with algae growth. Maximum production was observed in the exponential growth period. Thereafter the rate of algae growth and siderophore secretion started to decrease. Furthermore, increasing algae population resulted in secreting more siderophore and shortening the time needed to reach maximum production.

Key words: siderophore; iron-limited; CAS assay; *Prorocentrum donghaiense* Lu

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2001AA635040);国家海洋局青年基金资助项目(2005102);国家重点基础研究发展规划资助项目(2001CB409702);青岛市科技将材计划资助项目

收稿日期:2004-08-26;**修订日期:**2005-04-21

作者简介:王颜萍(1978~),女,山东德州人,硕士生,主要从事海洋科学研究。

* **通讯作者** Author for correspondence. E-mail: heyings@fio.org.cn

Foundation item: The National High Technology Research and Development Program of China (No. 2001AA635040); Youth Foundation of State Oceanic Administration (No. 2005102); National Key Basic Research Program (No. 2001CB409702); Project of Qingdao Government (Jiangcai plan)

Received date: 2004-08-26; **Accepted date:** 2005-04-21

Biography: WANG Yan-Ping, Master candidate, mainly engaged in marine science.

铁是海洋浮游植物生长所需的微量元素^[1],也是引发近岸赤潮的重要因素之一。地壳中铁含量丰富,而海洋中游离态铁的浓度却很低,主要以氢氧化物的沉积形式存在^[1],微生物组织对铁的吸收相当困难,广阔的铁营养源不能充分利用,因而在许多大洋中出现了高营养盐、低叶绿素(HNLC)海区^[2]。在铁限制条件下,许多原核生物能够分泌出一种低分子量的化合物,能够从氢氧化铁中夺取 Fe(Ⅲ),再经细胞膜受体将 Fe(Ⅲ)转移进生物体内,这种与铁具有极强配位能力的化合物通常称为铁载体^[1]。

关于铁载体的研究,国外起步较早,但多是针对陆源生物的病原菌、缺绿病等问题而进行的研究。随着近几年 HNLC 海区的出现以及铁限制假说的提出,人们对海洋原核生物分泌铁载体进行了广泛的研究,但对真核生物的研究相对较少^[3]。本文对海洋赤潮甲藻——东海原甲藻进行了铁限制培养,并对该藻类在富铁与缺铁条件下生长状况、生长过程中分泌铁载体的情况以及海藻接种量对铁载体分泌的影响进行了连续观测。

1 材料与方法

1.1 藻种

东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense* Lu)由本实验室选种、自行培养而得。

1.2 培养液与培养过程

天然海水和人工海水经过滤、灭菌后作为藻类培养液的基底。天然海水采自西北太平洋海区,各种营养物质均按表 1 加入。人工海水和痕量金属采用 Aquil 配方^[4],营养盐和维生素采用 f/2 配方,pH=8.0±0.1,盐度 30±2,各组分含量见表 1。配制人工海水和营养盐时,除 MgCl₂·6H₂O 和 CaCl₂ 之外,其它组分均要过 Chelex-100 柱,以消除铁及其它杂质的污染。

培养器皿经体积比为 15% HNO₃ 浸泡过夜,再用超纯水洗净。将培养液置于光照培养箱中,待适应环境后进行接种,控制温度(22±1)℃,光强 3500~4500 lx,昼夜比 L:D=12 h:12 h。

表 1 人工海水培养液的组成
Table 1 Compositions in the medium of artificial seawater

人工海水 Artificial seawater								
组成	NaCl	CaCl ₂	KBr	H ₃ BO ₃	Na ₂ SO ₄	NaHCO ₃	SrCl ₂ · 6H ₂ O	MgCl ₂ · 6H ₂ O
Compositions								
浓度(g L ⁻¹)	21	1.17	0.1	0.03	4.1	0.2	0.017	11.12
Concentration								
f/2 营养盐 Nutrients				f/2 维生素 Vitamines				
组成	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	NaNO ₃	Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	组成	VB12	D-Biotin	Thiamine HCl	
Compositions				Compositions				
浓度(mg L ⁻¹)	6	75	10	浓度(μg L ⁻¹)	0.5	0.5	100	
Concentration				Concentration				
Aquil 痕量金属 Trace metals								
组成	CuSO ₄ · 5H ₂ O	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	CoCl ₂ · 6H ₂ O	MnCl ₂ · 4H ₂ O	ZnSO ₄ · 7H ₂ O			
Compositions								
浓度(μg L ⁻¹)	0.25	1.85	0.6	4.55	1.15			
Concentration								

1.3 富铁与缺铁条件下藻类生长的比对实验

在 Aquil 痕量金属配方中,通过加或不加 Na₂EDTA·2H₂O 和 FeCl₃·6H₂O 以达到富铁与缺铁目的。取一定量处于指数生长期的原甲藻接入培养液中,每隔 24 h 进行 1 次细胞计数,观测藻类生长情况。

1.4 分泌铁载体实验

在 650 nm 左右,Fe(Ⅲ)-CAS 配合物有最大的吸收峰,而 CAS 配体则无吸收峰。由于铁载体对铁具有极强配位能力,可从 Fe(Ⅲ)-CAS 配合物中夺取 Fe(Ⅲ)引起吸光度的变化,从而定性或半定量确定铁载体的分泌情况,此方法被称为 CAS 实验^[5]。

$$\text{Fe(Ⅲ)}-\text{CAS}+\text{L} \rightarrow \text{Fe(Ⅲ)}-\text{L}+\text{CAS} \quad \Delta A=A(\text{未接种培养液})-A(\text{接种培养液})$$

CAS 反应液组成为 Fe³⁺(1.5×10⁻⁵ mol L⁻¹),CAS (1.5×10⁻⁴ mol L⁻¹),HDTMA (6×10⁻⁴ mol L⁻¹),以哌嗪和 HCl 为缓冲液,调节 pH=5.6。已接种的培养液经 10000 r/min 离心分离 40 min,取 4 ml 上清液与 1 ml CAS 溶液反应,90 min 后用 Agilent 8453 UV-Vis 系统(灵敏度可达 10⁻⁶mol L⁻¹数量级)进行测定,未接种培养液作为空白。

1.5 培养液中的铁含量测定

采用 Agilent ICP-MS 7500c 测定人工海水或天然海水培养液中 Fe 含量,其碰撞反应池可减少基体杂质的干扰,采用 H₂ 模式测定,灵敏度显著提高,检测限可达 10⁻⁶g L⁻¹数量级。

2 结果与讨论

2.1 富铁与缺铁条件下海藻生长的对比

东海原甲藻分别置于缺铁(14 nmol L^{-1})和富铁(280 nmol L^{-1})的天然海水培养液中的生长情况见图 1。由此可见,接种早期藻类生长差别并不明显,随着生长的不断进行,富铁条件下藻类生长迅速,从 $1.3 \times 10^3 \text{ cell ml}^{-1}$ 增长至 $1.6 \times 10^3 \text{ cell ml}^{-1}$, 4~5 d 达到生长旺盛期,随后呈现缓慢下降趋势;缺铁条件下藻类生长则处于衰减趋势($1.3 \times 10^3 \sim 0.78 \times 10^3 \text{ cell ml}^{-1}$),显然缺铁条件下藻类的生长状况远远不如在富铁条件下。

缺铁条件下,含有铁的培养液在接种时引入铁元素,从而使原甲藻在生长初期还能维持一定的生理需要、不断繁殖;但随着藻类的不断增多,有限的铁元素难以维持藻类的正常需要,逐渐出现了细胞密度降低、生长迟缓等现象,生长状态远远不如富铁条件下的情况。再次验证了“铁是海洋浮游植物生长所需要的微量营养元素”这一观点^[1]。

2.2 藻类生长状况对铁载体分泌的影响

为了验证铁载体的分泌情况是否与藻类的生长周期有关,对缺铁条件下的原甲藻生长过程进行了 CAS 跟踪实验。结果如图 2 所示:无论是天然海水还是人工海水培养液,随着藻类生长,铁载体分泌量不断增加,当藻类处于指数生长期或后期时,铁载体的含量也达到了最大值;之后,随着藻类的不断衰减铁载体的分泌也呈现下降趋势。

在藻类不断生长繁殖过程中,对铁的需求也不断增加,但由于铁资源难以维系更多藻类生长的需要,不断增多的藻类就会分泌出更多的铁载体,分泌的铁载体并不会无限制的增多,当藻类的生长出现衰减时铁载体的分泌量就会因藻体的减少而受到影响。因此,在进行铁载体研究时,一定要把握住藻类生长的各个状态。

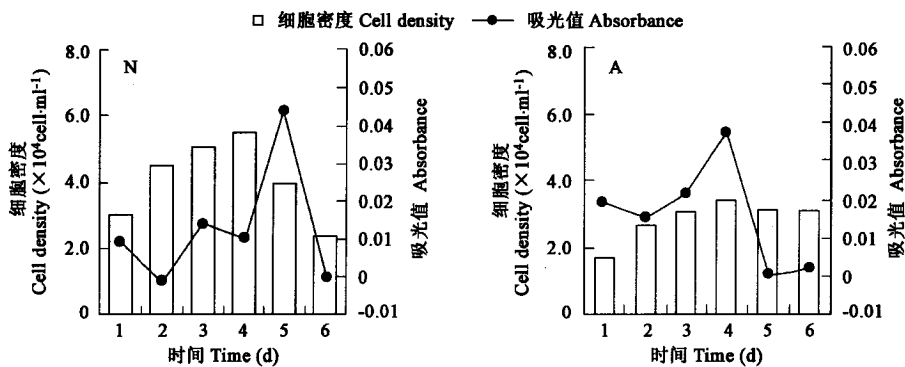


图 2 东海原甲藻分别在缺铁的天然海水(N)和人工海水(A)中生长以及 CAS 反应的铁载体分泌情况

Fig. 2 Growth of *P. donghaiense* Lu and CAS-reactivity in iron-deficient mediums of nature seawater(N) and artificial seawater(A)

2.3 培养液对原甲藻分泌铁载体的影响

在铁载体研究中,通常采用经 Chelex-100 处理的人工海水作为培养液,而对天然海水作为基底的报道却较少。东海原甲藻在不同基底培养液中的生长情况见图 2,结果发现:在天然海水和人工海水中,铁载体分泌随藻类生长的变化趋势虽然较为相似,但也受到基底不同的影响,在人工海水培养液中铁载体分泌的高峰期出现在指数生长期(第 4 天),而在天然海水培养液中却出现的较晚(第 5 天);此外,在铁载体连续观测中,天然海水培养液出现了起伏不定现象。

实验中使用的天然海水来自 HNLC 海区,铁含量低^[1],可以满足铁限制实验的要求,同时天然海水含有丰富的营养物质,这是人工海水所无法比拟的。但是天然海水组分较为复杂,可能存在干扰铁载体检测的物质(如卟啉、腐殖质)^[6],从而使铁载体的检测在生长初期就受到干扰,出现起伏不定的现象。此外,铁载体的高峰期出现在指数生长期之后,不利于铁载体的进一步研究。因此,在铁载体研究过程中,建议采用人工海水作为培养液较为适宜。

2.4 藻类的最初接种量对铁载体分泌的影响

东海原甲藻接种量对铁载体分泌的影响见图 3,由此可知:高接种量的藻类($1.8 \times 10^4 \text{ cell ml}^{-1}$ 和 $1.5 \times 10^4 \text{ cell ml}^{-1}$)分泌

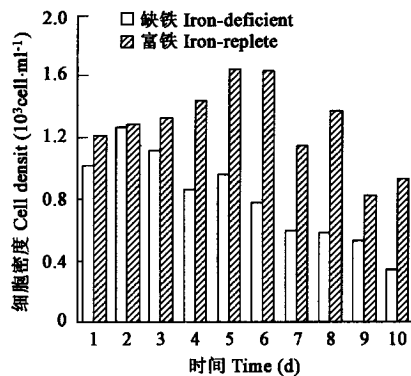


图 1 东海原甲藻在缺铁或富铁天然海水中生长情况

Fig. 1 Growth of *P. donghaiense* Lu in iron-deficient or iron-replete media of nature seawater

的铁载体可多达 0.04 AU~0.06 AU,而低接种量的藻类(3200 cell ml^{-1} 和 7100 cell ml^{-1})分泌量只有 0.01 AU~0.02 AU;高接种量藻类 4 d 就达到了分泌高峰期,而低接种量藻类的高峰期却相对延后。

藻类接种量对分泌铁载体量的影响可能与铁资源的竞争有关,由图 4 可见,在接种之初,引入的铁杂质会随着接种量的增加而增多,促进藻类的生长,高种量藻类($1.5\times 10^4\text{ cell ml}^{-1}$ 和 $1.8\times 10^4\text{ cell ml}^{-1}$)的曲线起伏较大、坡度较陡,藻类繁殖能力强,生长速度较快;与此同时,对有限铁资源的竞争也会越来越激烈,分泌的铁载体也就会越来越多,高峰期也相应的提前出现。而低接种量的藻类(3200 cell ml^{-1} 和 7100 cell ml^{-1})的曲线起伏变化并不十分明显,与之对应的生长速度和繁殖能力也变得十分缓慢;铁载体的分泌量也会削弱,到达高峰期的时间也会延长。

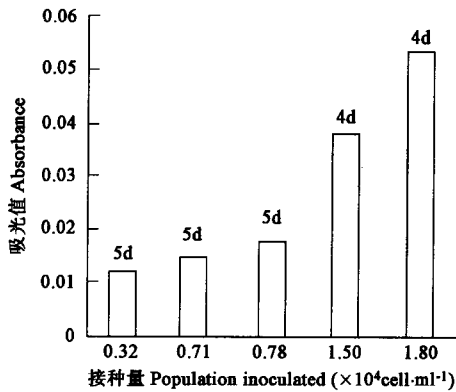


图3 接种数量对铁载体分泌量的影响

Fig. 3 Effect of population inoculated on Siderophore production

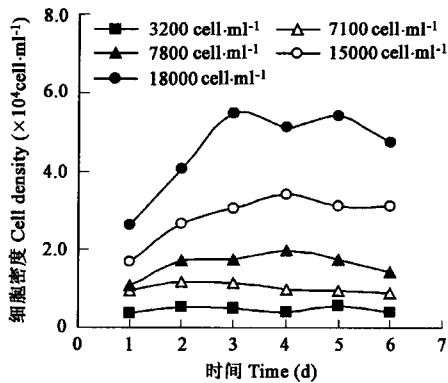


图4 不同接种量在缺铁条件下的生长

Fig. 4 Growth of different population inoculated the iron-deficient medium

3 结论

(1) 铁元素的不足严重影响了东海原甲藻的正常生长状态,使其分泌出一定量的铁载体以满足自身对铁的需求。从这一角度出发,东海原甲藻赤潮的发生是否与铁的含量及形态有关,还有待进一步研究探索。

(2) 随着东海原甲藻进入不同的生长阶段,其分泌的铁载体也发生着显著的变化,一般在指数生长期达到最高值;高接种量的藻类有利于获得更多的铁载体,并在较短时间到达峰值。藻类对铁载体分泌的动态影响不可忽视,这对深入研究铁载体的性质及其转运铁的机理至关重要。

(3) 选用人工海水培养液作为东海原甲藻的生长环境,不但可以避免大洋水引入的杂质干扰,而且也便于进行铁元素的控制。

References:

[1] Neilands J B. Microbial Iron Compounds. *Ann. Rev. Biochem.*, 1981, **50**: 715~731.

[2] Timmermans K R, Gledhill M, Nolting R F, *et al.* Responses of marine phytoplankton in iron enrichment experiments in the northern North Sea and northeast Atlantic Ocean. *Marine Chemistry*, 1998, **61**: 229~242.

[3] Harrison G I, Morel F M M. Response of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnol. Oceanogr.*, 1986, **31**(5): 989~997.

[4] Price N M, Harrison G I, Hering J G, *et al.* Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium aquil. *Biological Oceanography*, 1989, **6**: 443~461.

[5] Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Analytical Biochemistry*, 1987, **160**: 47~56.

[6] Tani H, Nishioka J, Kumaa K, *et al.* Iron(III) hydroxide solubility and humic—type fluorescent organic matter in the deep water column of the Okhotsk Sea and the northwestern North Pacific Ocean. *Deep-Sea Research I*, 2003, **50**: 1063~1078.