

Fe³⁺ 对雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 生长及荧光特性的影响

李涛, 李爱芬*, 张成武, 徐宁, 段舜山

(暨南大学水生生物研究中心, 广州 510630)

摘要: 为探求适宜雨生红球藻 CG-06 株生长的 Fe³⁺ 浓度和 Fe³⁺ 对藻细胞荧光特性的影响, 以 BBM 为基础培养基, 选用 EDTA-FeNa(Ⅲ) 为 Fe³⁺ 源, 设置 0、1.79、8.95、17.9、35.8、71.6 μmol·L⁻¹ 6 种 Fe³⁺ 浓度梯度, 实验测定藻的生长并分析不同 Fe³⁺ 对藻细胞叶绿素荧光和 77 K 低温荧光等的影响。结果表明: 适合雨生红球藻 CG-06 株生长的 Fe³⁺ 浓度为 8.95 μmol·L⁻¹, Fe³⁺ 浓度较高时, 雨生红球藻的生长受到抑制, Fe³⁺ 浓度低于 1.79 μmol·L⁻¹ 将产生高铁限制。Walz-PAM 测定数据显示, 在铁不足或高铁抑制条件下, 雨生红球藻光系统 II 活性明显下降, 开放态的反应中心数目减少, 光合作用受到抑制。77 K 低温荧光光谱显示, 在铁不足或高铁抑制条件下, 710 nm 荧光峰降低, 684 nm 和 694 nm 荧光峰相对增强, 说明能量在两个光系统分配上发生变化, 能量更多的分配给光系统 II, 限制了光系统 I 的活性。在高铁抑制条件下, CP₄₇ 蛋白荧光峰降低, CP₄₃ 蛋白荧光峰增强, 推测存在 D₁ 蛋白降解。

关键词: 雨生红球藻; Fe³⁺; 叶绿素荧光; 低温荧光

中图分类号: Q949.2; Q945

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)06-0643-07

Effects of Fe³⁺ on Growth and Fluorescence Characteristics of *Haematococcus pluvialis*

LI Tao, LI Ai-Fen*, ZHANG Cheng-Wu, XU Ning, DUAN Shun-Shan

(Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The optimal range of Fe³⁺ concentration for the growth of *Haematococcus pluvialis* CG-06 and the influences of Fe³⁺ on the photosynthesis of *H. pluvialis* were investigated by measuring optical density of algal culture, pigment changes, chlorophyll fluorescence and low temperature fluorescence spectrum. *H. pluvialis* CG-06 was grown in BBM media in batch culture and six Fe³⁺ concentrations (0, 1.79, 8.95, 17.9, 35.8, 71.6 μmol·L⁻¹) were obtained by adding different amount of EDTA-FeNa(Ⅲ). The results showed that the optimum Fe³⁺ concentration for growth of *H. pluvialis* CG-06 was 8.95 μmol·L⁻¹. However, at relatively higher Fe³⁺ concentrations or Fe³⁺ concentration lower than 1.79 μmol·L⁻¹, algal growth could be inhibited. The data of Walz-PAM showed that the activity of PS II was decreased significantly either at Fe³⁺-deficient condition or Fe³⁺-excessive condition and the number of open state reaction centers was reduced, resulting in inhibited photosynthesis. At either Fe³⁺-deficient condition or Fe³⁺-excessive condition, low temperature fluorescence emission spectrum showed that the peak at 710 nm was reduced while the peaks at 684 nm and 694 nm were enhanced, demonstrating that energy distribution between two photosystems was changed, with more energy being distributed to PS II and consequently limiting the activity of PS I. Under Fe³⁺-excessive condition, the fluorescence of PS II CP₄₇ decreased significantly, but that of PS II CP₄₃ increased relatively, which indicated that D₁ protein degradation might exist.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; Fe³⁺; Chlorophyll fluorescence; Low temperature fluorescence

铁作为微藻生长所必需的微量元素之一, 广泛参与光合作用、呼吸作用、物质的合成、营养盐吸收、

自由基的清除等重要生理过程^[1,2]。Boya、Martin 等国外学者报道, 在高营养盐低叶绿素 (HNLC) 的海

收稿日期: 2008-12-30, 修回日期: 2009-04-14。

基金项目: 珠海科技攻关重大项目 (PB20041018)。

作者简介: 李涛 (1981 -), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为微藻生物技术与生理生化。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: tiger@jnu.edu.cn)。

域,大面积撒播铁粉,能快速提高浮游植物的生物量,并由此提出,铁是海洋初级生产力的限制因子^[3,4]。室内实验也证明,铁对微藻的生长有明显的促进作用,缺铁会限制微藻的生长^[5-9]。

雨生红球藻是一种单细胞淡水绿藻,在胁迫条件下其红色不动孢子能快速合成虾青素,目前已经成为国际上研究的热点^[10]。高密度培养雨生红球藻的绿色游动细胞,提高生物量是实现雨生红球藻生产虾青素的关键之一,国内外学者在大量元素和培养条件的优化等方面做了大量的工作^[11-17]。铁作为一种微量元素,在目前可用于培养雨生红球藻的培养基中浓度存在较大差异,如 BBM 是 $17.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, MCM 是 $0.09 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, BG-11 是 $20.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, OHM 和 MAV 均为 $9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。一方面,实现雨生红球藻高密度培养所需的适宜铁浓度尚不确定,陆开形等^[18]报道的适合雨生红球藻生长的铁浓度范围为 $5.3 \sim 10.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,齐安翔等^[19]研究表明,铁浓度为 $18 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时最适宜雨生红球藻的生长。另一方面,作为微量元素铁对雨生红球藻光合生理的影响也未见有文献报道。

本研究从优化雨生红球藻培养基中铁浓度出发,探讨适宜雨生红球藻生长的铁浓度范围,并试图从机理上解释,缺铁、过量铁对雨生红球藻光合生理造成的影响,以期工业化培养雨生红球藻提供一定的数据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验藻种

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis* CG-06) 来自暨南大学水生生物研究中心藻种室。

1.2 培养方法

以 BBM 作为基础培养基^[20],采用 3000 r/min 离心,并用无铁的培养基重悬浮、再离心后接种,接种后藻液的吸光度在 0.07 左右。置于恒温光照培养箱中静置培养,培养容器为 500 mL 三角瓶,内装 300 mL 培养液,培养温度为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度为: $50 \sim 60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光暗周期为 12 h : 12 h。培养期间,每天定时摇瓶 2 次,防止藻细胞贴壁,实验周期为 20 d。

为了减少器皿的铁污染,实验所用的玻璃器皿均用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 浸泡 48 h,然后用去离子水冲洗干净,烘干, 121°C 高压灭菌后备用。

1.3 实验设计

用 EDTA-FeNa(Ⅲ) 配成 Fe^{3+} 的工作液,实验时分别加入到缺铁的 BBM 培养基中,使铁浓度依次达到 0、1.79、8.95、17.9、35.8、71.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,每个浓度设置 3 个平行。每隔 2 d 取样测定吸光度、叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素、叶绿素荧光参数等。实验过程中选取第 8 d、第 12 d 和第 18 d 测定 436 nm 激发下的 77 K 发射光谱。

1.4 测定方法

1.4.1 生物量工作曲线

活体吸光度:采用 UV-2450 双光束紫外可见分光光度计,扫描测定雨生红球藻绿色游动细胞的常温吸收光谱,得出藻液在 680 nm 处有最大吸收峰。因此,可以采用 OD_{680} 作为藻生长和生物量的参考指标。

藻细胞生物量 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):根据细胞生物量与 OD_{680} 之间的标准曲线,由下式计算得到 ($R^2 = 0.9973$):

$$\text{生物量}(\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = 0.558 \times \text{OD}_{680} - 0.0166.$$

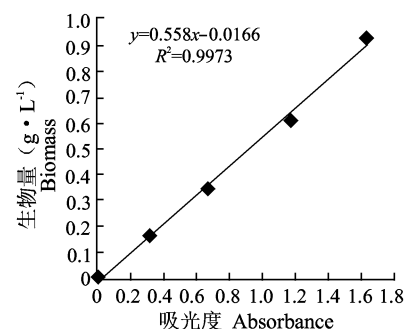


图 1 生物量-吸光度关系图

Fig. 1 The relationship between biomass and absorbance

1.4.2 叶绿素及类胡萝卜素的测定

按照波钦诺克的方法^[21]进行总胡萝卜素、叶绿素 a、叶绿素 b 含量的测定,并用以下公式计算:

$$\text{Chlorophyll a} = 9.78 \times A_{662} - 0.99 \times A_{644};$$

$$\text{Chlorophyll b} = 21.43 \times A_{644} - 4.65 \times A_{662};$$

$$\text{Carotenoid} = 4.7 \times A_{440} - (1.38 \times A_{662} + 5.48 \times A_{644}).$$

式中,叶绿素 a、叶绿素 b、总胡萝卜素的浓度为 mg/L; A_{662} 、 A_{644} 、 A_{440} 分别为 662、644、440 nm 波长下藻液的吸光度。

1.4.3 活体叶绿素荧光的测定

用德国 Walz 公司生产的 XE-PAM 脉冲调制式叶绿素荧光仪测定,取不同铁处理的藻液 5 mL,于

黑暗处预置 20 ~ 30 min。测定时,首先打开测量光 (PAR 约为 $8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$),测定初始荧光 (F_0),然后照射饱和脉冲光 (PAR 为 $1400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 0.8 s, 1 个脉冲),测定最大荧光 (F_m) 以及最大光化学效率 (F_v/F_m),然后打开光化光 ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 照射 5 min,再次打开饱和脉冲光测定实际光量子产量 (Φ_{PSII})、光化学淬灭系数 (qP)、非光化学淬灭系数 (qN) 等指标。

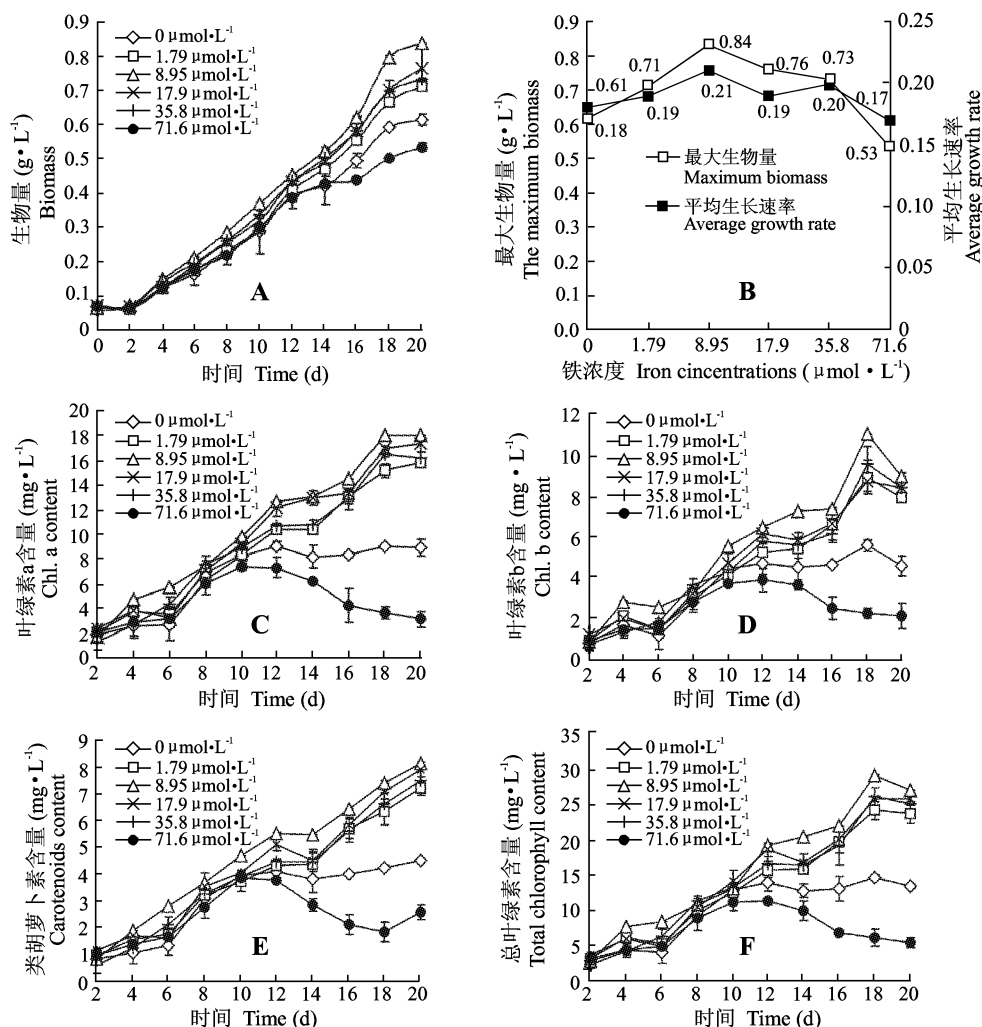
1.4.4 低温荧光光谱的测定

采用日立 F-4500 型荧光分光光度计 (HITA-CHI, Japan) 在低温 77 K 条件下测定荧光发射光谱,激发波长为 436 nm,发射光谱波长范围为 650 ~ 750 nm,狭缝间隙 2 nm,扫描速度 $240 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2 实验结果

2.1 不同浓度 Fe^{3+} 对雨生红球藻生长的影响

以 BBM 为基础培养基,实验 Fe^{3+} 浓度范围为 0 ~ $71.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,雨生红球藻的生长曲线、最大生物量和平均生长速率曲线见图 2:A, B。由图可以看出,雨生红球藻在 Fe^{3+} 浓度为 $8.95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BBM 培养基中生长最好,在整个培养周期内,生长明显优于其它实验组。至实验结束,获得了 $0.84 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的最大生物量,比其他各实验组分别增加了 25%、15%、9%、12%、36%,平均生长速率为 0.21,是所有实验组中最高的。雨生红球藻在 Fe^{3+} 浓度为 1.79 、 17.9 、 $35.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BBM 培养基中生



A. 生物量; B. 最大生物量和平均生长速率; C. 叶绿素 a 含量; D. 叶绿素 b 含量; E. 类胡萝卜素含量; F. 总叶绿素色素含量
A. Biomass; B. Maximum biomass and average growth rate; C. Chlorophyll a content; D. Chlorophyll b content; E. Carotenoids content; F. Total chlorophyll content

图 2 雨生红球藻在不同铁浓度条件下生长参数随时间变化的曲线

Fig. 2 The growth parameters of *H. pluvialis* CG-06 treated with different Fe^{3+} concentrations

长情况相似,分别取得了 0.71、0.76、0.73 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的最大生物量,平均生长速率分别为 0.19、0.19、0.20。统计学分析也表明,这 3 组之间的差异不显著。缺铁和 71.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高铁实验组的最大生物量分别是 0.61 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.53 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,平均生长速率分别为 0.18 和 0.17,明显低于其它实验组。

图 2:C、D、E、F 分别为雨生红球藻 CG-06 株生长过程中叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素、总叶绿素含量的变化曲线。由图可以看出,不同实验组雨生红球藻 CG-06 株的叶绿素和胡萝卜素含量的变化与藻生长变化趋势相似,当 Fe^{3+} 浓度为 8.95 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,叶绿素含量最高,为 29.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。缺铁和 71.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高铁实验组雨生红球藻色素含量明显低于其它实验组。

2.2 不同浓度 Fe^{3+} 对雨生红球藻光合生理的影响

2.2.1 叶绿素荧光参数的变化

叶绿素荧光可以灵敏地反映光系统 II 能量传递状况,表 1 是不同实验组雨生红球藻在第 16 d 时的活体叶绿素荧光参数。

F_v/F_m 代表光系统 II (PS II) 最大光化学效率,可以反映 PS II 反应中心内光能转换效率^[22],在正常生理条件下,该参数为一个稳定的值(藻类约为 0.65 左右),而胁迫条件下明显下降^[23]。由表 1 可以看出,缺铁和高铁组与其他实验组对比, F_v/F_m 均明显降低。

F_0 为初始荧光或基础荧光,是植物经过暗适应后,PS II 反应中心处于完全开放状态时的荧光产量,该参数的大小与激发光强度和叶绿素含量有关,是一种单纯的物理过程, F_0 升高预示着 PS II 反应中心受到了不可逆的伤害^[23]。由 $F_0/\text{Chl. a}$ 值可知,缺铁跟过量铁条件下, F_0 相对于自身的叶绿素

水平明显升高,说明 PS II 反应中心受到了严重的损伤。由表 1 还可以看出,过量铁实验组 $F_0/\text{Chl. a}$ 较缺铁实验组大,说明过量铁对藻细胞光合系统的破坏要大于缺铁状态。

F_v 下降,表明非适宜铁浓度降低了 PS II 反应中心氧化态的质醌 Q_A 数量,使质醌 $Q_A \rightarrow$ 质醌 Q_B 传递电子的能力下降, F_v/F_0 和 F_m/F_0 值的明显下降,说明铁也影响了 PS II 捕获激发能的效率。

Φ_{PSII} 反映了 PS II 反应中心在环境胁迫中部分关闭情况下的实际原初光能捕获效率,可以反映实际的 PS II 反应中心进行光化学反应的效率^[22]。本实验中,在 1.79 ~ 35.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铁浓度范围内,随着铁浓度的增加, Φ_{PSII} 值出现了略微增加;铁不足或高铁组, Φ_{PSII} 值显著降低,说明高铁和缺铁均降低了 PS II 反应中心进行光化学反应的效率。

光化学猝灭系数 qP 值的大小反映了 PS II 原初电子受体 Q_A 的氧化还原状态和 PS II 开放中心的数目,其值越大,说明 PS II 的电子传递活性越高。从表 1 中的数据可以看出,高铁和缺铁条件下 qP 都明显下降,预示着藻细胞 PS II 电子传递效率下降。

非光化学猝灭系数 qN 是藻细胞吸收的光能中不用于光合电子传递而以热的形式耗散的部分。缺铁降低了非光化学所利用的能量,过量铁时,qN 比其他实验组高,说明高铁使雨生红球藻的辐射耗散能力增强,以保护光系统免受损伤。

2.2.2 77 K 低温荧光发射光谱

铁对藻细胞光合作用的影响也可以通过低温荧光光谱来体现。图 3 为培养第 18 d 时雨生红球藻的低温荧光发射光谱。从图中可以看出, Fe^{3+} 浓度在 1.79 ~ 35.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,发射光谱的形状基

表 1 培养第 16 d 时雨生红球藻的叶绿素荧光参数

Table 1 Chlorophyll a fluorescence parameters of *H. pluvialis* CG-06 on the sixteenth day

Fe^{3+} 浓度 Fe^{3+} concentrations	F_0	F_m	F_v	F_v/F_m	F_v/F_0	F_m/F_0	$F_0/\text{Chl. a}$	Φ_{PSII}	qP	qN
0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	339	1022	683	0.668	2.015	3.015	41	0.558	0.875	0.093
1.79 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	341	1247	906	0.726	2.657	3.657	26	0.637	0.912	0.102
8.95 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	352	1284	932	0.725	2.648	3.648	24	0.640	0.925	0.124
17.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	348	1288	940	0.729	2.701	3.701	26	0.641	0.915	0.106
35.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	344	1304	960	0.736	2.791	3.791	27	0.646	0.912	0.106
71.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	296	771	475	0.616	1.605	2.605	70	0.479	0.856	0.145

注: F_0 :初始荧光; F_m :最大荧光; F_v :可变荧光; F_v/F_m :PS II 最大光量子产量; F_v/F_0 :PS II 潜在光化学活性; F_m/F_0 :用来反映 PS II 电子传递情况; Φ_{PSII} :实际光量子产量;qP:光化学猝灭系数;qN:非光化学猝灭系数; $F_0/\text{Chl. a}$:单位质量叶绿素 a 的初始荧光

Notes: F_0 : Minimal fluorescence; F_m : Maximal fluorescence; F_v : Variable fluorescence; F_v/F_m : Maximal photochemical efficiency of PS II; F_v/F_0 : The potential activity of PS II; F_m/F_0 : The electron transport intensity of PS II; Φ_{PSII} : Actual photochemical efficiency of PS II; qP: Coefficient of photochemical quenching; qN: Coefficient of nonphotochemical quenching; $F_0/\text{Chl. a}$: Minimal fluorescence of unit mass of chlorophyll a

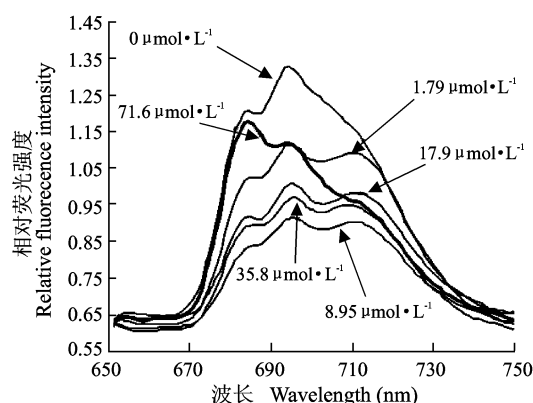


图3 不同铁浓度下雨生红球藻的77 K
荧光发射光谱(激发光为436 nm)

Fig.3 Fluorescence emission spectra of *H. pluvialis*
CG-06 under different Fe³⁺ concentrations
(Excitation wavelength 436 nm)

本相似, F_{695}/F_{685} 和 F_{695}/F_{710} (见表2)基本接近。说明在适宜 Fe³⁺ 浓度情况下,光系统的结构没有发生变化。缺铁组 710 nm 荧光峰不明显,685 nm 和 695 nm 荧光峰的相对高度跟适宜铁浓度的一样。高铁组,685 nm 荧光峰增强,710 nm 荧光峰降低,说明光系统结构发生了变化。

表2 荧光发射峰比值

Table 2 The ratio of fluorescence emission peak

荧光峰比值 Ratio of fluorescence emission peak	Fe ³⁺ 浓度 Fe ³⁺ concentrations (μmol·L ⁻¹)					
	0	1.79	8.95	17.9	35.8	71.6
F_{695}/F_{685}	1.10	1.09	1.09	1.10	1.08	0.95
F_{695}/F_{710}	1.17	1.02	1.01	1.02	1.02	1.17
F_{685}/F_{710}	1.07	0.94	0.92	0.93	0.94	1.23

3 讨论

3.1 不同浓度铁对雨生红球藻生长的影响

本实验结果证明,适量的 Fe³⁺ 对雨生红球藻的生长具有明显的促进作用。从生长曲线和色素的变化曲线可以看出,能促进雨生红球藻生长的 Fe³⁺ 浓度范围在 1.79 ~ 35.8 μmol·L⁻¹ 之间,最适的 Fe³⁺ 浓度为 8.95 μmol·L⁻¹,这一结果与陆开彤等^[18]报道雨生红球藻最适合的铁浓度为 8.92 μmol·L⁻¹ 相近。当铁浓度低于 1.79 μmol·L⁻¹ 时,培养后期会出现缺铁限制,当铁浓度超过 8.95 μmol·L⁻¹ 时,如果增加培养基中铁的量,不能促进藻细胞的生长,表明藻细胞对铁的吸收利用达到饱和状态。铁浓度为 71.9 μmol·L⁻¹ 时,藻细胞的生长受到严重的抑制。雨生红球藻常用培养基中铁的浓度各不相同,根据

本实验的结果,建议在雨生红球藻培养时,调整原有培养基配方中铁的浓度,使铁浓度在 8.95 μmol·L⁻¹ 左右。关于 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 哪种形式更适合雨生红球藻的生长,将另文发表。

叶绿素是藻细胞吸收光能的天线分子,也是光系统重要的组成部分,铁通过铁类卟啉氧化酶来调节原叶绿素酯并最终调节叶绿素的合成^[24]。本实验也证明,高铁和缺铁都严重影响叶绿素的合成,实验第 10 d,缺铁组叶绿素的合成受阻。分析原因可能为铁缺乏影响了铁类卟啉氧化酶的活性,从而抑制了叶绿素的合成。而适宜的铁浓度下,叶绿素的含量比无铁实验组增加 75% ~ 110%,可见铁在叶绿素合成中发挥了重要的作用。

铁对藻类生长的作用主要通过调节各种与铁有关的酶来实现。细胞代谢过程中存在大量与铁有关的蛋白酶,如细胞色素、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶、Fe-S 中心、硝酸还原酶、琥珀酸脱氢酶等^[25]。如果铁浓度不适宜,会影响这些酶的活性,从而对藻细胞生长产生影响。铁对藻类的影响作用是多种因素交叉的结果,如叶绿素的合成需要铁类卟啉氧化酶参与,还需要一些含氮和碳的前体化合物参与,铁的浓度会影响硝酸还原酶的活性,影响氮素的利用。铁的浓度也会影响光合作用固碳的效率,从而叶绿素合成需要的前提物质减少,叶绿素的合成是这几种因素共同作用的结果。

缺铁组从培养第 10 d 开始才与适宜铁实验组出现了差异,由于实验前没有进行铁的饥饿培养,推测在藻细胞内存在铁的储存机制,在外界环境铁浓度不适宜的情况下,细胞仍能利用自身储存的铁进行正常的代谢活动。已有文献报道,在丰富的铁浓度条件下,大部分的铁以铁蛋白的形式贮存在叶绿体中,铁以 5Fe₂O₃·9H₂O 的形式存在,外面包被 15 ~ 28 kD 的蛋白壳^[26]。

3.2 不同浓度铁对雨生红球藻光合生理的影响

光合作用是藻细胞生命活动中重要的代谢过程,是藻细胞其他代谢活动所需能量和有机物的供应过程,光合作用如果受到抑制,藻类生长所需的物质和能量供应就会降低,阻碍藻类的正常生长^[7]。

已有大量研究表明,缺铁会引起光合作用效率的下降。韩志国等^[5]研究尖刺拟菱形藻(*Pseudonitzschia pungens* Grunow)时证实缺铁会抑制光系统的活性,朱明远等^[6]报道铁不足可以降低浮游植物的光合效率,欧明明等^[8]研究报道铁限制可以引起铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* Kutz)能量在PS I

和 PS II 分配的差异,吕秀平等^[9]研究报道缺铁降低颤藻(*Oscillatoria planctonica* Woloszynska)的光合效率。Kolber^[27]在赤道太平洋 HNLC(高营养盐低叶绿素)海域撒播铁粉后发现, F_v/F_m 由0.3逐渐恢复至0.63。

本实验同样证明缺铁能降低藻的光合作用效率,过量的铁也可以抑制光合作用的进行。77 K 低温荧光光谱可以看出,在过量铁的条件下,685 nm 荧光发射峰增强,685 nm 是 PS II 核心蛋白复合物 CP₄₃的特征荧光峰,CP₄₃荧光峰增强,说明本应该传递给反应中心的能量未能有效传递到,而是仅仅传递到 CP₄₃。推测原因是,高铁引起反应中心 D₁ 蛋白降解,使与 D₁ 蛋白结合的 CP₄₃分离,从 LHC II(捕光色素蛋白复合物)传递来的能量在经 CP₄₃向反应中心传递时受阻,所以造成能量在 685 nm 处耗散增强。在缺铁的情况下,核心蛋白复合物 CP₄₃与核心蛋白复合物 CP₄₇的特征荧光峰与适宜铁组相比较基本没有变化,推测在缺铁的情况下,并没有引起光系统结构的破坏。引起光合效率降低的主要原因可能是,电子由原初电子受体 Q_A向 Q_B传递过程中,需要铁元素的参与;缺铁时,电子不能有效地传向 Q_B,电子堆集在 Q_A侧,形成大量 Q_A⁻,造成开放态的 Q_A减少,引起光合效率的降低。

Cytb₅₅₉是一种含铁的血红素蛋白,存在于所有放氧光合生物中的 PS II-RC 中,它在 PS II 组装、水氧化、光保护中起了重要的作用^[28]。推测缺铁或过量的铁引起 Cytb₅₅₉蛋白损伤,进而引起光合效率下降。Cytb_{6/f}复合体是连接 PS II 和 PS I 的枢纽,该复合体中具有高电势的 2Fe-2S 型铁硫蛋白(Rieske 铁硫蛋白)在电子传递过程中起了重要的作用^[28]。由 77 K 低温荧光光谱看出,在缺铁和高铁条件下,PS II 和 PS I 在能量的分配上出现了不同,能量更多的分配在 PS II,推测原因是:缺铁和高铁抑制了 2Fe-2S 型铁硫蛋白的活性,使电子由 PS II 向 PS I 传递过程受到抑制。

铁对光合作用的影响还表现在降低了叶绿素水平,从而降低了细胞捕获光能的能力,使光合效率降低。

3.3 展望与建议

工业化培养雨生红球藻,要求细胞达到很高的密度。在高密度的培养环境中,细胞的遮光效应明显,藻细胞为了更好地获得光能,必须增加捕光色素的量来适应这种外界环境的变化。而色素的合成离不开铁的参与,所以在培养过程中必须保证铁的充

足。在开始本实验前,我们测定了雨生红球藻对数生长后期 BBM 培养基中剩余铁的量,实验结果证明,到培养后期培养液中铁的量已经很少,通过计算得知铁的消耗率为 96.1%,这么低的铁浓度可能成为阻止藻继续分裂繁殖因素之一。所以建议工业化培养时,尽量保持铁的浓度在 8.95 ~ 35.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,这既可以减少因为铁过量造成的成本浪费,也可以保证藻还没有到最大密度时,就因为铁限制而停止生长。确定在整个培养周期中铁的添加工艺,还需要进行铁的消耗动力学研究。由于铁元素在水中的存在形式多样,可以形成水合态的,也可以形成沉淀和胶体,这些形式的铁都是不易被藻细胞利用的,而只有络合态的铁最容易被藻细胞吸收^[7],所以在添加铁的时候要同时添加络合剂。

参考文献:

- [1] 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]. *J Phycol*, 1999, 35: 1171 - 1190.
- [2] Geider R J. Complex lessons of iron uptake[J]. *Nature*, 1999, 400: 815 - 816.
- [3] 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.
- [4] Martin J H, et al. Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea[M]. New York: Plenum Press, 1992: 123 - 137.
- [5] 左冬梅, 韩志国, 武宝轩. 铁对尖刺拟菱形藻生长及光合作用的影响[J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 2002, 23(5): 81 - 87.
- [6] 朱明远, 牟学延, 李瑞香, 等. 铁对三角褐指藻生长、光合作用及生化组成的影响[J]. 海洋学报, 2000, 22(1): 110 - 116.
- [7] 陈慈美, 蔡阿根, 陈雷. 铁对海洋硅藻的生物活性形式及其对藻类生长的影响[J]. 海洋通报, 1993, 12(1): 49 - 55.
- [8] 欧明明, 蔡伟民. 铁限制对铜绿微囊藻光系统活性变化的影响[J]. 环境化学, 2005, 24(6): 651 - 653.
- [9] 吕秀平, 胡晗华, 等. Fe³⁺对浮游颤藻生长和光合作用的影响[J]. 水生生物学报, 2005, 29(3): 318 - 322.
- [10] 魏东, 臧晓南. 大规模培养雨生红球藻生产天然虾青素的研究进展和产业化现状[J]. 中国海洋药物, 2001, 84(5): 4 - 8.
- [11] Cifuentes A S, Gonzalez M A, et al. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions[J]. *Biol Res*, 2003, 36: 343 - 357.
- [12] Borowitzka M A, Huisman J M, Osborn A. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* (I): effects of nutrients on growth and cell type[J]. *J Appl Phycol*, 1991, 3: 295 - 304.
- [13] 邱保胜, 刘其芳. 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*-6B)培养条件研究[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 1999, 33(1): 112 - 118.

- [14] 陈兴才,黄伟光,欧阳琴. 雨生红球藻培养及虾青素累积条件探讨[J]. 中国食品学报,2006,(4):41-45.
- [15] Usha T, Sarada R, et al. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media[J]. *Bioresource Technol*, 1999,68:197-199.
- [16] 庄惠如,陈必铤,王明兹,等. 雨生红球藻混合营养与异养培养研究[J]. 微生物学通报,2000,27(3):198-201.
- [17] Chen F, Chen H, Gong X D. Mixotrophic and heterotrophic growth *Haematococcus lacustris* and rheological behaviour of the cell suspensions[J]. *Bioresource Technol*,1997,62:19-24.
- [18] 陆开形,蒋霞敏,翟兴文. 不同营养盐浓度对雨生红球藻生长的影响[J]. 淡水渔业,2003,33(3):13-15.
- [19] 齐安翔. 高产虾青素的雨生红球藻培养及培养模式的若干研究[D]. 厦门:厦门大学,2006.
- [20] Lorenz R Todd, Cysewski Gerald R. Commercial potential for *Haematococcus micmalgae* as a natural source of astaxanthin[J]. *Trends Biotech*,2000,18:160-167.
- [21] 波钦诺克. 植物生物化学分析方法[M]. 荆家海,丁钟荣,译. 北京:科学出版社,1981:255-259.
- [22] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J]. 植物学通报,1999,16(4):444-448.
- [23] 林世青,许春辉,张其德,等. 叶绿素荧光动力学在植物抗性生理学、生态学和农业现代化的应用[J]. 植物学通报,1992,9(1):1-16.
- [24] Spiller S C, Castelfranco A M, Castelfranco P A. Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis *in vivo* observations on iron and oxygen-deficient plants[J]. *Plant Physiol*,1982,69(1):107-111.
- [25] 吕秀平. Fe³⁺对三种微藻生长和生理的影响[D]. 北京:北京化工大学,2005.
- [26] Crichton R P, Charleaux-Wauters M. Iron transport and storage Eur[J]. *Biochem*,1987,164(3):485-506.
- [27] Kolber Z, Wyman K D, Falkowski P G. Natural variability in Photosynthetic energy conversion efficiency: A field study in the Gulf of Maine[J]. *Limnol Oceanogr*,1990,35(1):72-79.
- [28] 匡廷云. 光合作用原初光能转换过程的原理与调控[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2003.