

杜氏盐藻对不同价态铁的吸收机制研究^{△*}

凌娜¹, 仲星¹, 李红秀¹, 王帆¹, 茅云翔², 孙雪³

(1. 哈尔滨商业大学理科研究院, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;
3. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:目的 通过向培养液中添加不同浓度的硫酸亚铁和三氯化铁, 研究其对盐藻生长的影响, 及盐藻对不同价态铁的吸收机制。方法 紫外分光光度计检测其对盐藻生长的影响, 原子吸收检测盐藻胞外溶解态、吸附态和胞内吸收态铁的富集规律, 并用红外光谱检测盐藻富集前后红外吸收的变化。结果 当硫酸亚铁的浓度为 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、三氯化铁的浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 盐藻生长较旺盛。随着培养周期的延长, 胞外溶解态铁逐渐降低, 膜吸附态和胞内吸收态铁呈现增长趋势, 整个培养周期, 铁的总量保持不变。另外, 铁离子的添加并未对盐藻细胞分子官能团产生伤害。结论 当硫酸亚铁浓度为 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 盐藻具有最好的生长状态, Fe^{2+} 是盐藻的主要吸收形式, 盐藻对铁的吸收是 1 个循序渐进的过程。

关键词:杜氏盐藻; 铁; 生长曲线; 原子吸收; 红外光谱

中图分类号: R931 文献标志码: A 文章编号: 1002-3461(2015)03-029-06

Absorption mechanism of *Dunaliella salina* under different valent iron

LING Na¹, ZHONG Xing¹, LI Hong-xiu¹, WANG Fan¹, MAO Yun-xiang², SUN Xue³

(1. College of Science research, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;
2. College of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
3. Collgeg of Marin Sciences, Ning bo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Objective To study the absorption mechanism of *Dunaliella salina* under different iron concentrations and valence. **Methods** The growth curve of *D. salina* was measured by ultraviolet spectrophotometer. Dissolved, adsorption and intracellular absorption state of iron were determined by atomic absorption spectrometry, and the change of infrared absorption spectra was analyzed before and after iron bio-enrichment. **Results** When *D. salina* exposed to $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$ or $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe}^{3+}$, it had the highest growth rate and absorption efficiency. As culture cycle went on, extracellular solution iron decreased constantly, adsorption and intracellular absorbtion iron showed a rise. The total of iron remained unchanged during the whole culture cycle. Addition of iron to *Dunaliella salina* did not harm the functional groups. **Conclusion** *D. salina* grew best in the medium with $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeSO}_4$. Ferrous was the main absorbed form of *D. salina*, and the absorption of iron is a gradual process.

Key words: *Dunaliella salina*; iron; growth curve; atomic absorption; infrared spectroscopy

杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) 为无细胞壁单细胞绿藻, 其形态通常为卵圆形, 当外界渗透压发

生变化时, 藻可随之变化为球形、梨形及纺锤形。盐藻细胞内含有丰富的蛋白质、多糖、甘油、 β -胡萝

* [△]作者简介: 凌娜(1979-), 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为藻类功能食品的研发及海洋生物活性物质研究。Tel: 0451-84866922, E-mail: lingnaqd@163.com.

收稿日期: 2014-12-10

胡萝卜素等多种营养成分,是1种在食品、医药保健、化工和养殖业中具有独特经济价值的微藻。其中β-胡萝卜素的含量可达细胞干重的10%以上^[1-2]。β-胡萝卜素作为VA的前体,能使皮肤和黏膜细胞正常化并可维持视网膜正常的功能。β-胡萝卜素具有增强机体免疫功能、抗氧化、预防癌症、心血管疾病及抗衰老等作用^[3]。铁是浮游植物光合电子传递链和呼吸链的重要组成部分,是叶绿素合成中某些酶或辅酶的活化剂,缺铁可导致叶绿素含量降低。铁还是硝酸盐和亚硝酸盐还原酶系的重要组成部分,对增强硝酸盐、亚硝酸盐的还原效率、转移速率作用十分显著。在一定条件下,铁可成为藻类生长的限制因子^[4-6]。铁是生物体不可或缺的微量元素之一,人体缺铁会影响身体发育、导致精神系统异常及免疫力下降等^[7]。本文研究了不同浓度及不同价态Fe对杜氏盐藻生长的影响,以及盐藻富集铁的吸收机制,以期为新型富铁盐藻保健品及功能性食品的研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要设备

ALC-110.4型电子天平、XS-212-201型光学显微镜、722紫外分光光度计、光照培养箱、超净工作台、恒温水浴锅、高速离心机、电热恒温干燥箱、震荡仪、超声波细胞粉碎机、原子吸收分光光度计、红外光谱吸收仪。

1.2 藻种及培养

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)由宁波大学海洋生物工程教育部重点实验室赠予。盐藻采用改良f/2培养基:KNO₃ 100 mg·L⁻¹、KH₂PO₄ 10 mg·L⁻¹、FeSO₄·7H₂O 2.5 mg·L⁻¹、MnSO₄ 0.5 mg·L⁻¹、EDTA-二钠 20 mg·L⁻¹;海水为人工配制,盐度35;在光照培养箱中培养,温度(24±1)℃,pH=7~8,光照强度3 000~5 000 lx,光暗周期12H:12D。每天摇动3次,培养至生长旺盛颜色呈鲜绿色并处于对数生长期。

1.3 铁富集培养

250 mL三角瓶中加入30 mL藻液,接种量为20%,初始接种密度1.2×10⁵ mL⁻¹,培养7d以去除培养基中Fe²⁺的干扰。随后分别向培养液中添加1 000 μmol·L⁻¹ FeSO₄·7H₂O和FeCl₃·6H₂O母液,使培养液中铁离子终浓度分别为

6.25、12.5、25.0、50.0 μmol·L⁻¹;每个处理设3个重复,以不加铁为空白对照组。每天对藻细胞的生长密度进行测定,检测共进行15 d。

1.4 测定方法

1.4.1 生长曲线的测定

每天定时用722紫外分光光度计测定盐藻在A_{450nm}处的吸光度并绘制盐藻的生长曲线。

1.4.2 盐藻生物量的测定

采用干重法测定,测定一系列盐藻梯度稀释液的光密度值,再将藻液分别干燥至恒重后称重,以此绘制DW-A标准曲线。

1.4.3 盐藻富集量的测定

参照Franklin分离法^[8],将盐藻体系中的Fe分为胞外溶解态、胞内吸收态和胞外膜吸附态。取10 mL藻液,离心(5 000 r/min, 20 min),取5 mL上清液,用来测定藻细胞外溶解态Fe。将藻液再次离心(5 000 r/min, 5 min),弃上清液,然后加入4 mL 0.02 mol·L⁻¹的EDTA溶液,震荡30 s,以洗下吸附在细胞表面的Fe,再经离心(6 000 r/min, 20 min),取上清液,用于测定藻细胞外吸附态Fe。剩余藻泥加入2 mL浓硝酸和1 mL高氯酸,静置过夜,经加热消解直至藻液变澄清透明,此时将消化液全部转移到10 mL容量瓶中,用双蒸水定容,用于测定盐藻细胞内吸收态Fe。分别用原子吸收分光光度计测定样品中胞外溶解态、胞内吸收态及胞外吸附态Fe的含量。

1.4.4 盐藻红外光谱的测定

藻液用微孔滤膜过滤,藻泥经双蒸水冲洗2~3次,冷冻干燥24 h至恒重,研磨成粉末,经KBr压片,采用Equinox-55型红外光谱仪测定盐藻生物富集铁前后的红外吸收光谱。

2 结果

2.1 不同价态铁对盐藻生长的影响

如图1所示,培养前3 d是盐藻生长的迟缓期,在第4~12 d内藻细胞处于对数生长期,13~14 d藻细胞处于稳定期,14 d以后藻细胞进入衰亡期。盐藻在铁浓度为6.25~25 μmol·L⁻¹范围内生长速率均高于空白组,50 μmol·L⁻¹时生长速率低于对照组,表现出一定的抑制作用,不利于盐藻生长。其中FeSO₄和FeCl₃分别在12.5和25 μmol·L⁻¹浓度下长势最旺盛。

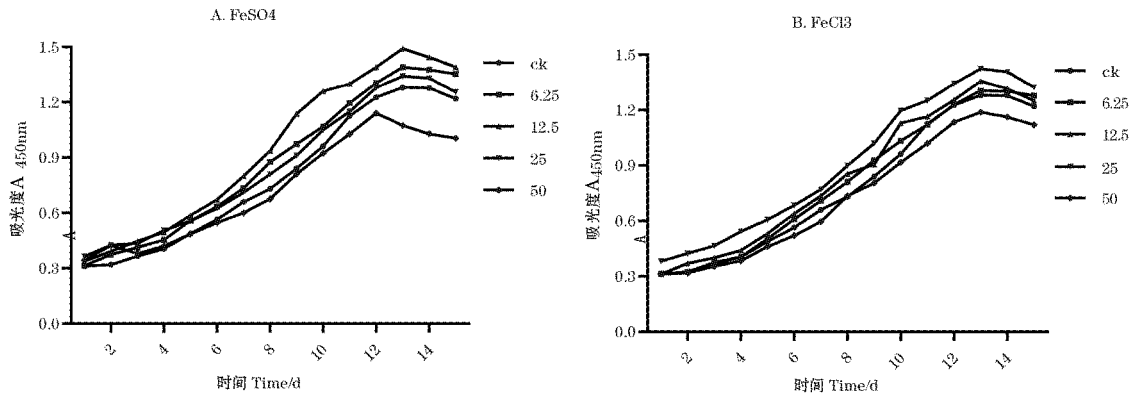


图 1 不同价态的铁对盐藻生长曲线的影响

Fig. 1 The growth curve of *Dunaliella salina* with different iron valence

2.2 铁对盐藻生物量的影响

如图 2 所示,可见当 $A < 1.4$ 时, DW 与 A 有较好的线性关系,回归方程为 $Y = 5.6296x + 0.2528$ (相关系数 $R^2 = 0.9953$),其细胞干重可直接通过测定光密度值来确定。研究发现盐藻生物量随着铁浓度的增加呈现先升后降的趋势,当 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 分别为 12.5 和 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,盐藻生物量最高,分别为 $5.29 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (见表 1)。

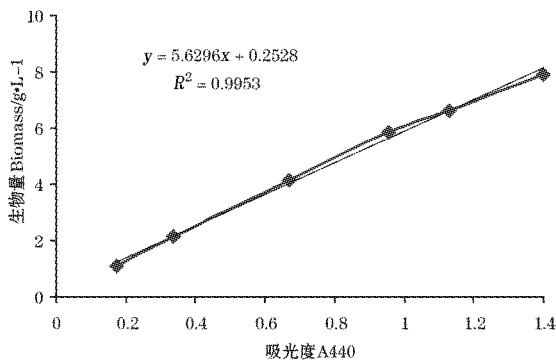


图 2 盐藻 DW-A 标准曲线

Fig. 2 DW-A curve of *Dunaliella salina*

表 1 铁对盐藻生物量的影响

Table 1 Effect of iron on biomass of *D. salina*

Fe 浓度 $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	生物量/Biomass $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	
	Fe^{2+}	Fe^{3+}
0	3.96	3.96
6.25	4.15	4.32
12.5	5.29	3.85
25	4.69	5.03
50	3.98	3.25

2.3 铁对盐藻富集量的影响

结果显示:胞外溶解态的铁和吸附态的铁随着铁添加浓度的增加而升高,胞内吸收态的铁呈现先升后降的趋势。 Fe^{2+} 在 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时具有最大胞内吸收量, Fe^{3+} 在 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下胞内吸收量最大,且略低于 Fe^{2+} 在 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的胞内吸收量。同时,一定浓度下两种不同价态铁的总量基本保持一致,但略高于铁的添加浓度,原因可能是前期实验藻种的饥饿培养未能完全消除胞外吸附态和胞内吸收态铁的影响(见表 2)。

表 2 铁对盐藻富集量的影响

Table 1 Effects on bio-enrichment of *Dunaliella salina* under different iron valence

铁浓度 $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$Fe^{2+} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$				$Fe^{3+} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			
		溶解态	吸附态	吸收态	总量	溶解态	吸附态	吸收态	总量
		Solution	Adsorption	Absorption	Total	Solution	Adsorption	Absorption	Total
0	0	—	0.01	0.02	0.03	—	0.01	0.02	0.03
6.25	0.35	0.00	0.03	0.35	0.38	0.09	0.05	0.24	0.38
12.5	0.70	0.04	0.21	0.50	0.75	0.29	0.20	0.26	0.75
25	1.40	0.38	0.65	0.42	1.45	0.31	0.64	0.49	1.44
50	2.80	1.21	1.30	0.38	2.89	1.25	1.33	0.32	2.90

2.4 盐藻对铁的吸收规律

选取盐藻添加 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 $12.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fe 含量为 $0.70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fe 含量为 $1.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 将体系中 Fe 分为胞外溶解态、胞外膜吸附态和胞内吸收态, 通过原子吸收测定各形态 Fe 浓度变化, 如图 3 所示: 随着培养周期的增长, 盐藻胞外溶液态 Fe 在第 3 天左右急剧下降, 后期减少趋势稍有缓和, Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 分别由 0.665 和

$1.351 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降到 0.042 和 $0.309 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。胞外膜吸附态 Fe 和胞内吸收态 Fe 随着培养周期的延长呈现上升趋势, 第 9 天后, 胞外膜吸附态基本呈平稳趋势, 分别在 0.17 和 $0.63 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 附近波动, 变幅不大。而胞内吸收态和胞外溶解态呈良好的对比关系, 在第 13 天后基本保持稳态。整个培养周期, 铁的总量基本保持不变, Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 分别为 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

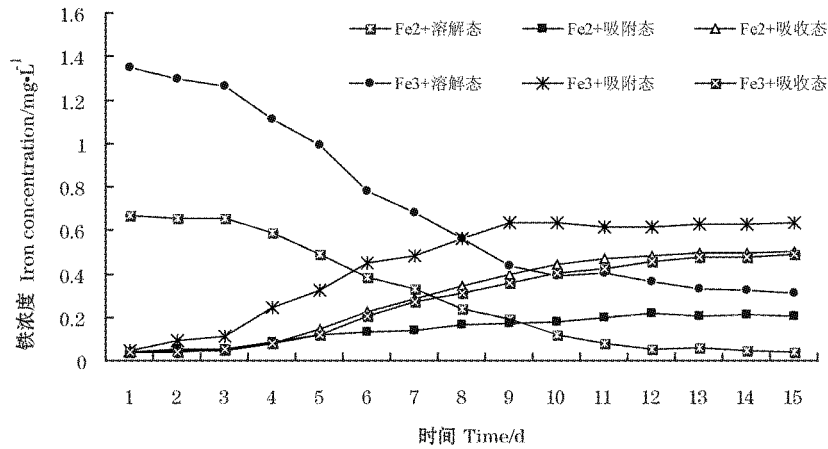


图 3 不同形态铁的吸附量的变化

Fig. 3 Changes in the adsorption capacity of different iron forms

2.5 盐藻铁富集前后红外吸收光谱的比较

分子中细胞官能团在红外光谱中存在一定的特征吸收峰, 对官能团的识别要考虑吸收峰的频率、强度峰行等多方面因素, 但最主要的因素还是看峰值的位置是否改变。富铁培养和非富铁培养的盐藻红外吸收光谱如图 4 所示: 盐藻生物富集

铁离子前后其吸收峰位置基本没有改变, 仅是峰形有所变化, 即吸收强度的变化。由此证明, 铁离子生物富集处理并未对盐藻细胞分子官能团结构产生伤害, 可能仅是取代了某些离子而与生物配体结合。

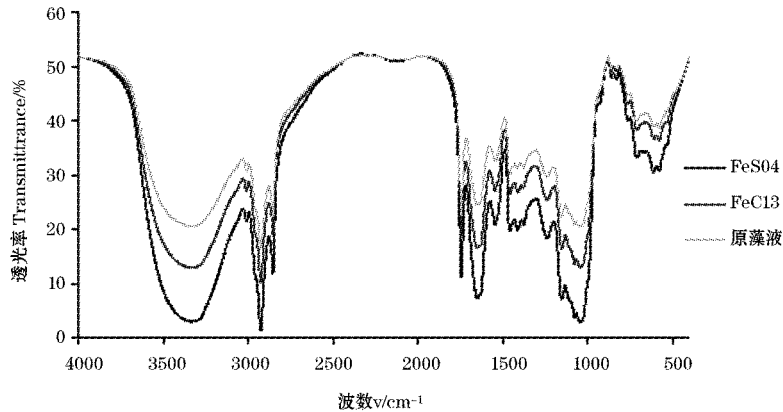


图 4 盐藻铁富集的红外吸收光谱

Fig. 4 IR spectrum of *Dunaliella salina* with iron enrichment

3 讨论

铁是海洋动植物生长的重要微量营养元素和催化元素,对细胞有效利用营养物质及光合作用过程起着重要的作用。铁在水中的存在形式非常复杂,有三价的铁[Fe³⁺]、二价的铁[Fe²⁺]、铁的螯合物和氢氧化铁等,并且铁的多种形态是可以相互转化的。在含氧水层中,铁以三价铁稳定存在;在缺氧水层中,亚铁离子是比较稳定的,亚铁离子与大多数阴离子形成的盐是溶解性的。研究表明,不同价态的铁以及不同有机配合态的铁对藻类的影响有差别,藻类更趋向于吸收胶体水合氧化铁(Fe-NTA),不同形态的铁之间可以相互转化,胶体态的铁比颗粒态的铁更活跃,亚铁是藻类可以直接吸收利用的 1 种形态^[9-10]。相同初始浓度下,四尾栅藻对 Fe²⁺ 的吸收速率大于 Fe³⁺,表现出更快的增长时效^[11]。本研究中,铁对盐藻的生长、生物量的累积以及胞内富集量均有较好的促进作用。当 Fe²⁺ 浓度为 12.5 μmol · L⁻¹、Fe³⁺ 为 25 μmol · L⁻¹ 时,盐藻生物量及富集量均达到较理想状态,且铁的生物富集处理并未对盐藻细胞分子官能团结构产生伤害。相同初始浓度下,盐藻对 Fe²⁺ 的吸收利用率高于 Fe³⁺。依据 Shaked 等^[12] 提出的浮游植物铁吸收模型,浮游植物对 Fe 的吸收主要以 Fe²⁺ 为主。藻类对铁的吸收主要包括铁置换和蛋白转运 2 个过程。细胞膜上存在 1 种二价金属离子转运蛋白(divalent metal transport 1, DMT1),铁与该蛋白有 2 个结合位点。Fe²⁺ 作为 1 种典型的二价金属离子,可以直接被膜蛋白转运,是 1 种 H⁺ 依赖的主动转运过程。在培养中,Fe²⁺ 培养组能直接吸收利用培养基中的游离态 Fe²⁺,藻类较早地进入对数生长期。Fe³⁺ 在进入细胞前需要经过光诱导还原、微生物还原等一系列生化反应作用被还原为 Fe²⁺,再被藻类吸收利用,只有少部分 Fe³⁺ 能通过 S 置换进入细胞内。而 Fe³⁺ 在水中的存在形式非常复杂,且可以相互转化,同时受微生物本身及周边环境的影响。因此,盐藻对 Fe²⁺ 的吸收好于 Fe³⁺,Fe²⁺ 先吸附到盐藻表面然后通过某些特定载体的转运作用进入细胞内,进行新陈代谢。

关于铁对盐藻富集的影响中,随着铁浓度的增加,胞外溶解态的铁和吸附态的铁呈现增加的

趋势,而胞内吸收态的铁趋于先升后降的趋势。但铁的总量略大于添加浓度。可能的原因是前期盐藻进行铁的“饥饿”培养时,胞内吸收态铁和膜外吸附态铁有部分残留,培养前期胞内吸收态与吸附态有一定数值,导致 3 种形态的铁之和略大于添加浓度。

进一步选择 Fe²⁺ 浓度为 12.5 μmol · L⁻¹、Fe³⁺ 为 25 μmol · L⁻¹ 进行铁的吸收规律的研究。随着培养周期的延长,胞外溶解态的铁持续降低,膜外吸附态和膜内吸收态的铁呈现升高趋势,分别于第 9 天和第 13 天趋于平稳。可能的解释是:①在铁源充足时,盐藻吸收胞外溶解态进行自身代谢合成,导致溶解态铁始终处于下降趋势,直至被吸收完全。②二价金属离子转运蛋白位于细胞膜位置,吸收的溶解态铁必须经过其转运作用才能进入体内供细胞使用。培养周期前期,转运蛋白与铁离子的结合位点相对充足,故胞外溶解态 Fe 可以顺利进入细胞内,随着转运蛋白结合位点的饱和,胞外吸附态 Fe 与胞内吸收态 Fe 达到 1 个动态平衡,即胞外吸附态铁浓度增加到一定程度后开始逐渐趋于稳定。后续细胞对铁的吸收,主要以铁的置换作用为主要趋势。铁置换过程是以 S 为中心,与外界铁配合物发生置换反应,结合生成 FeS,经过特殊通道将铁运输到细胞内。Fe³⁺ 经过还原酶的作用还原成 Fe²⁺,然后借助二价金属离子转运蛋白转运到胞内供细胞使用。当水中存在 Fe²⁺ 时,以蛋白转运为主要吸收路线,当 Fe²⁺ 胞外吸收稳定后,以铁置换作用为主要吸收路线^[12-14]。③随着培养周期的延长,胞内吸收态铁浓度随着生物量的增加而增加,体现出良好的增长一致性。④整个培养周期,3 种形态铁之和基本保持不变,Fe²⁺ 约为 0.75 mg · L⁻¹、Fe³⁺ 约为 1.43 mg · L⁻¹,符合物料守恒原理。由于前期饥饿培养造成藻内存留少量铁,导致总量大于初始添加的 0.70 mg · L⁻¹ 和 1.40 mg · L⁻¹。综上所述,盐藻对 Fe 的利用分步进行,Fe²⁺ 先吸附到藻类表面然后通过某些特定载体的转运作用进入体内进行新陈代谢,这是一个多因素影响的复杂的过程。

参考文献

- [1] 洪利亚. 杜氏盐藻富碘培养及生物学作用[D]. 天津: 天津科技大学, 2012.
- [2] 梁秀芝, 刘成君, 彭峰, 等. 六种盐藻的营养成分[J]. 食品科技, 2007, 1: 206-209.
- [3] 伍先绍, 贺稚非, 龚霄. 杜氏盐藻及其在功能食品中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2008, 2: 127-130.
- [4] 凌娜, 孙庆岩, 茅云翔, 等. 铁对蛋白核小球藻生长及营养品质的影响[J]. 中国海洋药物, 2014, 33(4): 45-49.
- [5] 孔赞, 邹培, 宋黎明, 等. 铁对藻类生长及藻毒素合成影响研究进展[J]. 应用生态学报, 2014, 25(5): 1533-1540.
- [6] Briat J F, Dubos C, Gaymard F. Iron nutrition, biomass production, and plant product quality [J]. *Trends Plant Sci.*, 2014, S1360-1385.
- [7] 朱媛媛, 庄红, 张婷, 等. 血红素铁研究进展[J]. 肉类研究, 2010, 5: 18-23.
- [8] Franklin N M, Stauber J L, Matkich S J, et al. pH dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp) [J]. *Aquat Toxicol*, 2000, 48: 275-289.
- [9] 邢伟, 李敦海, 沈银武, 等. 滇池试验围隔内不同形态铁浓度的变化与物化因子的关系[J]. 水生生物学报, 2006, 30(2): 146-151.
- [10] Morrissey J, Bowler C. Iron utilization in marine cyanobacteria and eukaryotic algae. *Front Microbiol*, 2012, 3: 43-55.
- [11] 胡权, 王志红, 刘立凡, 等. 不同价态铁对四尾栅藻生长的影响及机理探讨[J]. 给水排水, 2014, 40(1): 115-119.
- [12] Shaked Y, Kustka A B, Morel F M M. A general kinetic model for iron acquisition by eukaryotic phytoplankton [J]. *Limnol Oceanogr*, 2005, 50(3): 872-882.
- [13] Carmel N, Tel-Or E, Chen Y, Pick U. Iron uptake mechanism in the chrysophyte microalga *Dinobryon*[J]. *J Plant Physiol*, 2014, 171(12): 993-997.
- [14] 胡权. 不同价态铁对藻华爆发影响规律及其机理研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2013.