

EDTA 和铁对铜绿微囊藻和四尾栅藻生长和竞争的影响

储昭升¹, 金相灿^{1*}, 阎峰², 郑朔方¹, 庞燕¹, 曾清如²

(1. 中国环境科学研究院湖泊环境创新基地/国家环境保护湖泊污染控制重点实验室, 北京 100012; 2. 湖南农业大学资源环境学院, 长沙 410128)

摘要: 铁限制不但会影响浮游植物的种群密度, 而且会影响浮游植物的群落结构. 为了探讨有机配体和铁的作用对湖泊中浮游植物的种群竞争, 采用批量培养的方法, 研究了不同 EDTA 及 Fe 浓度下, 太湖蓝藻铜绿微囊藻和绿藻四尾栅藻的生长和竞争. 结果表明, 较高浓度的 EDTA ($\geq 13.5 \mu\text{mol/L}$) 可以抑制铜绿微囊藻的生长, 但不抑制四尾栅藻, 因而有利于四尾栅藻占据优势; 铁的浓度由 $3 \mu\text{mol/L}$ 增大至 $18 \mu\text{mol/L}$ 时, 可缓解较高浓度 EDTA ($13.5 \sim 27 \mu\text{mol/L}$) 对铜绿微囊藻的抑制作用, 而增大其它微量元素浓度 (B、Mn、Zn、Cu、Mo 等) 则无此作用; 说明高浓度 EDTA 与铁的螯合作用能抑制铜绿微囊藻而不抑制四尾栅藻. 高浓度 EDTA 对 2 种藻具有不同影响的原因可能是 2 种藻对铁的吸收机制不同.

关键词: 铜绿微囊藻; 四尾栅藻; EDTA; Fe

中图分类号: X524 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)11-2457-05

Effects of EDTA and Iron on Growth and Competition of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus quadricauda*

CHU Zhao-sheng¹, JIN Xiang-can¹, YAN Feng², ZHENG Shuo-fang¹, PANG Yan¹, ZENG Qing-ru²

(1. State Environmental Protection Key Laboratory for Lake Pollution Control, Research Center for Lake Ecology & Environments, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China; 2. College of Resources & Environment, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: Not only population density of phytoplankton but also its community structure were influenced by iron limitation. The growth and competition of a cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and a green alga *Scenedesmus quadricauda* at different iron and EDTA concentrations were investigated using batch cultures. The results showed that the growth of *M. aeruginosa* was significantly inhibited whereas *S. quadricauda* wasn't when EDTA at high concentrations ($\geq 13.5 \mu\text{mol/L}$), and consequently, it favored the dominance of *S. quadricauda*. Moreover, increasing iron concentration from $3 \mu\text{mol/L}$ to $18 \mu\text{mol/L}$ could greatly alleviate the growth inhibition of *M. aeruginosa* while increasing concentration of other microelements e. g. B, Mn, Zn, Cu, Mo didn't. These results suggest that high EDTA concentration decreases iron availability for *M. aeruginosa*, but not for *S. quadricauda*. The reason that the two algae respond to high EDTA concentrations differently is that their adsorption strategies for iron should be different.

Key words: *Microcystis aeruginosa*; *Scenedesmus quadricauda*; EDTA; Fe

由于浮游植物对铁有较高的需求量, 因此, 在海洋和淡水生态系统中都存在初级生产力的铁限制现象^[1~4]. 海洋中存在较多的“高营养盐低叶绿素”区域, 研究表明其原因是总铁浓度较低, 而且低含量的铁与胶体及有机配体络合导致了铁对浮游植物的限制^[1,2]; 在淡水水体中, 总铁含量虽然较高, 但铁与水体强有机物配体络合也可能导致浮游植物铁限制^[3,4], 也就是说藻类的现存量不仅受总铁浓度的影响, 更受铁的形态影响.

铁限制不但会影响浮游植物的种群密度, 而且可能会影响浮游植物的群落结构. 在铁限制的情况下, 一些蓝藻能分泌高选择性铁的有机配体 (siderophore), 以增强对铁的吸收; 同时, 这些

siderophore 会抑制真核藻类对铁利用, 从而可能导致蓝藻在水体中占据优势^[5]; Matz 等^[6]认为, 蓝藻分泌的 siderophore 对真核藻类也可能具有直接的毒性, 如水华鱼腥藻分泌的 siderophore 对莱哈衣藻有直接的毒性. 在水环境中, 存在着大量机配体 (如腐殖质), 与藻类存在着复杂的作用^[7,8], 它们能够络合金属离子, 并不同程度地影响铁对于浮游植物的生物可利用性. 由于不同的藻类对铁的需求差异很大^[9], 且吸收机制也不同^[5,10], 水体中有机物质的增加会

收稿日期: 2006-12-20; 修订日期: 2007-02-13

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2002CB412301); 科研条件工作项目 (JG-2004-24)

作者简介: 储昭升 (1973 ~), 男, 副研究员, 主要研究方向为湖泊富营养化及水华, E-mail: chuzs@cras.org.cn

* 通讯联系人, E-mail: jinxu@cras.org.cn

对不同藻类产生不同程度的影响,从而可能影响到浮游植物的种群结构,进而影响水华的发生.

然而,水体有机配体,尤其是对铁络合能力较强的配体,对不同藻类的影响的研究非常缺乏.在湖泊富营养化过程中,水体有机物含量不断升高.水体中大多数有机配体和 EDTA 的络合能力相近,且均没有特异性.本研究试图通过螯合配体 EDTA 和铁的作用,对太湖蓝藻铜绿微囊藻和绿藻四尾栅藻竞争的影响,来探讨水体有机配体和铁对太湖浮游植物群落结构以及蓝藻水华发生的影响.

1 材料与方法

1.1 藻种及培养基

铜绿微囊藻 (FACHB-912) *Microcystis aeruginosa* Kütz.,由中国科学院水生生物研究所淡水藻种 (FACHB) 库提供,最初分离自太湖;四尾栅藻 *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb 由太湖富营养化水体中分离得到.

实验用培养基 M_{II} 的组成如下: $NaNO_3$ 100 mg/L, K_2HPO_4 10 mg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 75 mg/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 40 mg/L, $Fe-citrate \cdot 5H_2O$ 6 mg/L, Na_2CO_3 20 mg/L, $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 1 mg/L. 微量元素 A5 液组分如下: H_3BO_3 61 mg/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 169 mg/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 287 mg/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2.5 mg/L, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 12.5 mg/L.

1.2 藻类培养实验

铜绿微囊藻和四尾栅藻均在 M_{II} 培养基中培

养,通过改变培养基中柠檬酸铁和 EDTA 的浓度来研究铁和 EDTA 的影响:①在较低的铁浓度 ($c_{Fe} = 3.0 \mu mol/L$) 下,研究不同 EDTA 浓度中 (0.27、2.7、13.5、27 $\mu mol/L$) 铜绿微囊藻和四尾栅藻的竞争;②分别增加铁和其它微量元素 (添加 A₅ 液),改变微量元素与 EDTA 的比例,研究铜绿微囊藻和四尾栅藻的生长和竞争.

2 种藻在 500 mL 三角瓶中 (200 mL 培养液),于光照培养箱 (白光) 中培养,光照强度为 $25 \mu mol \cdot (m^2 \cdot s)^{-1}$,光暗比为 12 h:12 h. 2 种藻的接种密度均为 1×10^4 cells/mL. 培养基的初始 pH 值用 0.5 mol/L 的 HCl 或 NaOH 调节至 8.0.

藻细胞用血球计数板 (Minato TATAI) 在光学显微镜 (Olympus BH-2) 下计数,每次计数细胞 30~300 个,每个样品计数 3 次.当细胞密度每天增长小于 5% 时,认为该实验组达到最大生物量,即可停止实验.

2 结果与讨论

2.1 EDTA 对铜绿微囊藻和四尾栅藻生长的影响 ($c_{Fe} = 3.0 \mu mol/L$)

单藻培养结果表明,高浓度 EDTA ($\geq 13.5 \mu mol/L$) 明显抑制铜绿微囊藻的生长,而且 EDTA 浓度的越大,抑制效果越明显;但 EDTA 对四尾栅藻的生长没有明显的影响,在 0.27~27 $\mu mol/L$ 的 EDTA 范围内,四尾栅藻的生长曲线相似,最大生物量 ($t = 23$ d) 无显著差异 ($p > 0.05$) (图 1).

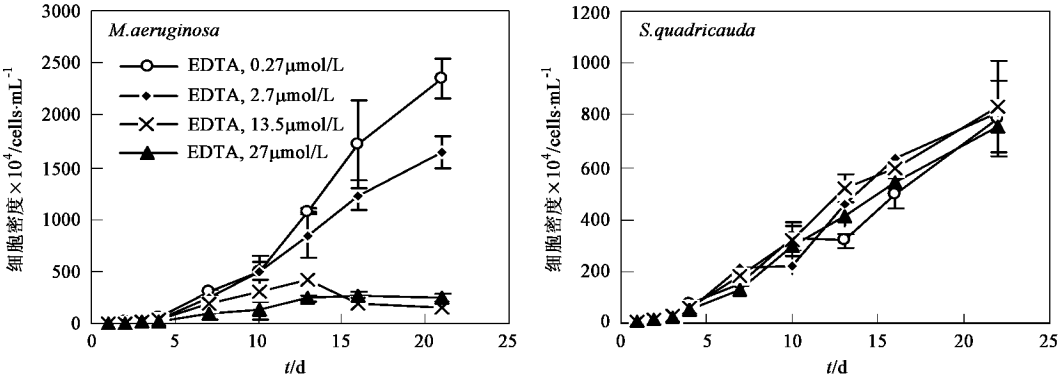


图 1 不同 EDTA 浓度对铜绿微囊藻和四尾栅藻单藻培养的影响 ($c_{Fe} = 3.0 \mu mol/L$)

Fig.1 Effect of EDTA concentration on the growth of *M. aeruginosa* and *S. quadricauda* in uni-algal cultivation ($c_{Fe} = 3.0 \mu mol/L$)

在接种量相同的情况下,铜绿微囊藻和四尾栅藻的竞争结果表明,当 EDTA 浓度较低时 ($\leq 2.7 \mu mol/L$),铜绿微囊藻和四尾栅藻都生长很好,而且

两者生长曲线相似,最大生物量 ($t = 20$ d) 没有显著差异 (EDTA 为 $0.27 \mu mol/L$ 和 $2.7 \mu mol/L$ 时 p 值分别为 0.444 和 0.364); 而当 EDTA 浓度较高时 (≥ 13.5

$\mu\text{mol/L}$), 四尾栅藻生长良好, 铜绿微囊藻明显受到

抑制, 四尾栅藻占据优势(图 2)。

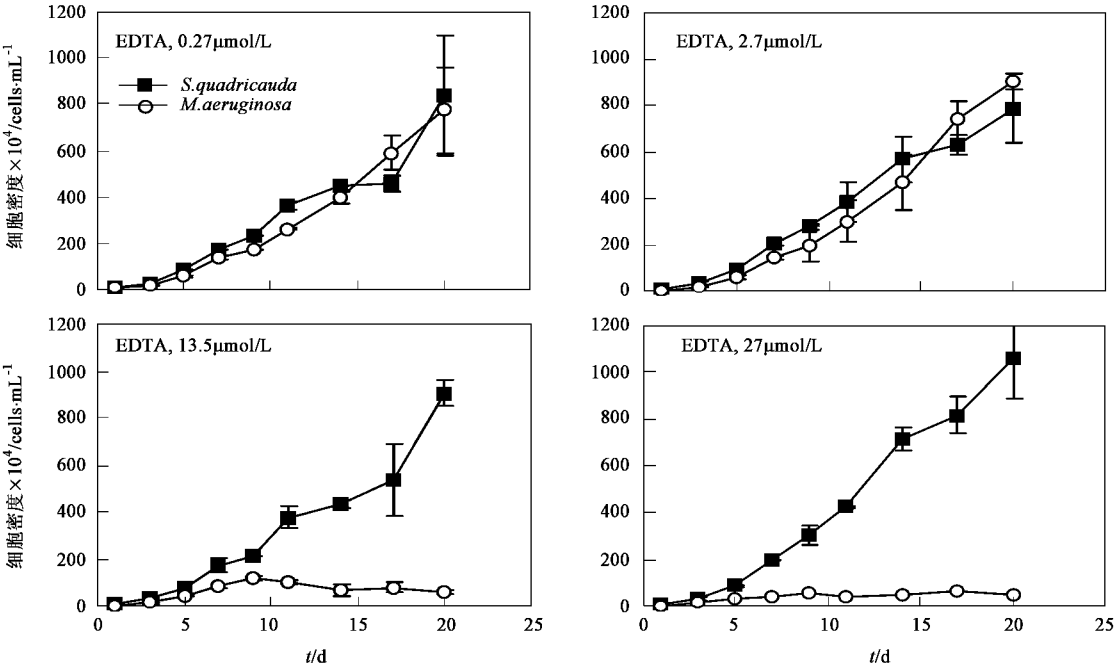


图 2 混藻培养体系中 EDTA 浓度对铜绿微囊藻和四尾栅藻竞争的影响($c_{\text{Fe}} = 3.0 \mu\text{mol/L}$)

Fig.2 Effect of different EDTA concentration on competition of *M. aeruginosa* and *S. quadricauda* in co-cultivation($c_{\text{Fe}} = 3.0 \mu\text{mol/L}$)

有机配体 EDTA 能和大多金属元素形成稳定的络合物, 在藻类培养基中, EDTA 可用作金属离子缓冲剂. 在很多海洋藻类培养实验中, 也常通过添加高浓度的 EDTA($\geq 100 \mu\text{mol/L}$)来模拟海水中铁限制条件下浮游植物的生长^[11]. 在本研究中, 高浓度的 EDTA 抑制铜绿微囊藻的生长而对四尾栅藻没有影响, 其原因可能是高浓度的 EDTA 与某种微量元素络合, 降低了该元素对铜绿微囊藻的生物可利用性.

2.2 添加微量元素 A_5 液对铜绿微囊藻在高浓度 EDTA 中生长的影响($c_{\text{Fe}} = 3.0 \mu\text{mol/L}$)

M_{11} 培养基并未单独添加 B、Mn、Zn、Cu、Mo 等 5 种藻类生长所必须的微量元素, 在其它营养盐中通常都含有这些元素的杂质, 因而能够满足藻类生长的需要. 但在高浓度 EDTA 的情况下, 这些微量元素与 EDTA 的络合作用可能使藻类生长受限制. 图 3 表明, 在高浓度 EDTA($27 \mu\text{mol/L}$)条件下, 添加 1 倍及 5 倍的 A_5 液不能改善铜绿微囊藻的生长状态, 相反, 5 倍的 A_5 液对铜绿微囊藻的生长产生了抑制作用. 说明较高浓度的 EDTA 与 B、Mn、Zn、Cu、Mo 等 5 种微量元素的络合作用, 并未造成这些元素的限制.

2.3 添加铁后 EDTA 对 2 种藻抑制作用的影响

图 4 表明, 当铁的浓度由 $3 \mu\text{mol/L}$ 增大至 $18 \mu\text{mol/L}$ 时, 可明显缓解高浓度 EDTA($27 \mu\text{mol/L}$)对铜

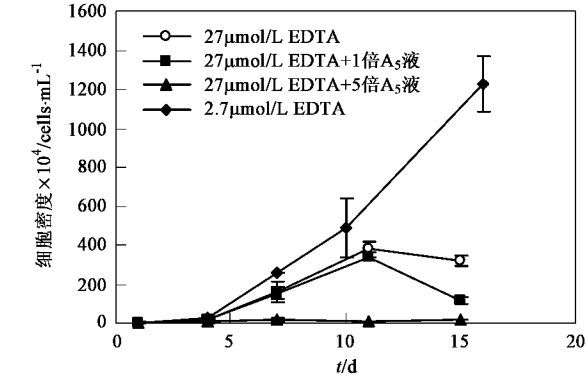


图 3 添加微量元素对铜绿微囊藻生长的影响($c_{\text{Fe}} = 3.0 \mu\text{mol/L}$)

Fig.3 Effect of minor elements on *M. aeruginosa* growth($c_{\text{Fe}} = 3.0 \mu\text{mol/L}$)

绿微囊藻的抑制作用, 其生长曲线与 $2.7 \mu\text{mol/L}$ EDTA + $18 \mu\text{mol/L}$ Fe, 以及 $0.27 \mu\text{mol/L}$ EDTA + $3 \mu\text{mol/L}$ 的对照样相似, 最大生物量相差仅为 20%. 进一步加大 EDTA 的浓度至 $135 \mu\text{mol/L}$ 时, 微囊藻的生长又受到了强烈的抑制.

当铁的浓度为 $18 \mu\text{mol/L}$ 时, EDTA 在 $2.7 \sim 135 \mu\text{mol/L}$ 范围内变化, 四尾栅藻的生长均没有受到明显的影响(图 4). 比较图 1 和图 4 还可以发现, 当铁浓度超过 $3 \mu\text{mol/L}$ 时, 增加铁和 EDTA 浓度都不会明

显影响四尾栅藻生长,四尾栅藻在不同的 EDTA (0.27 ~ 135 $\mu\text{mol/L}$)和铁浓度(3 ~ 18 $\mu\text{mol/L}$)下培养的最大生物量相差不到 25%.

2 种藻的混合培养表明(图 5),在高铁条件下 (18 $\mu\text{mol/L}$),当 EDTA 浓度低于 27 $\mu\text{mol/L}$ 时,铜绿微

囊藻与四尾栅藻的生物量差别不大,当 EDTA 增大至 135 $\mu\text{mol/L}$ 时,四尾栅藻明显占据优势.与低铁条件(3 $\mu\text{mol/L}$)相比(图 2),四尾栅藻占据优势所需的 EDTA 浓度明显增高了.

以上实验说明,高浓度的 EDTA 可以抑制铜绿

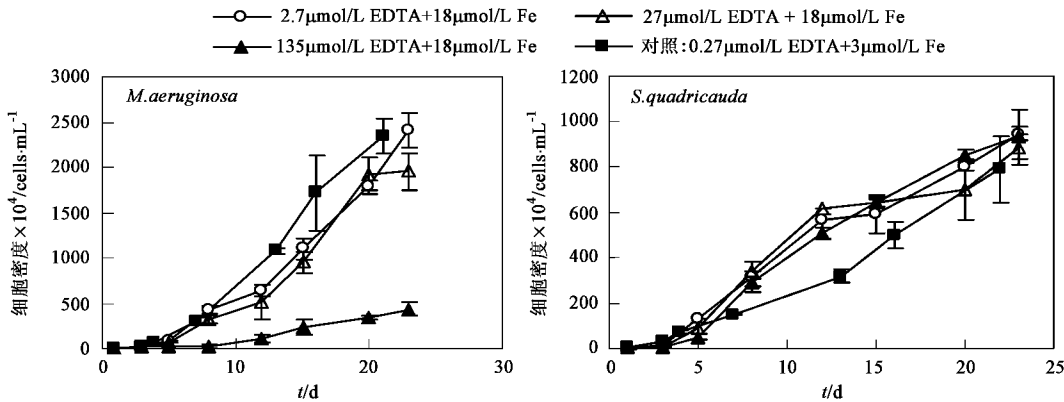


图 4 高铁浓度下不同 EDTA 浓度对铜绿微囊藻和四尾栅藻单藻培养的影响

Fig.4 Effects of high Fe concentration and different EDTA concentration on unialgal cultivation of *M. aeruginosa* and *S. quadricauda*

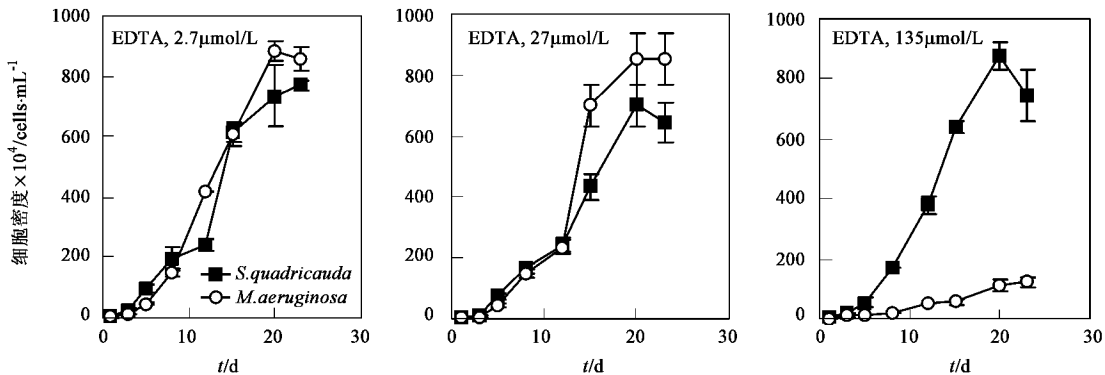


图 5 高铁浓度下(18 $\mu\text{mol/L}$)不同 EDTA 浓度对铜绿微囊藻和四尾栅藻混合培养的影响

Fig.5 Effects of EDTA concentration on competition of *M. aeruginosa* and *S. quadricauda* at high Fe concentration in mixed cultures (18 $\mu\text{mol/L}$)

微囊藻的生长而不抑制四尾栅藻,有利于四尾栅藻占据优势;而且,高浓度的 EDTA 对铜绿微囊藻生长的抑制作用是通过 EDTA 与铁的络合,降低了铁的生物有效性实现的.

高浓度的 EDTA 能抑制铜绿微囊藻对铁的吸收而不抑制四尾栅藻,其原因可能是 2 种藻对铁的吸收机制不同.在铁限制条件下,藻类对铁的吸收利用主要有 2 种方式.第 1 种是分泌 siderophore,与策略 II 型植物相同,siderophore 与铁的络合物可穿过细胞膜^[12],已经发现不少蓝藻和绿藻都采取这种方式^[13~15];第 2 种方式是分泌三价铁离子螯合物的还原酶(FCR),与策略 I 型植物类似^[16~20],将三价铁离

子螯合物还原成二价铁离子和螯合物配体,然后 Fe^{2+} 被输送到细胞内得以利用.FCR 有很强的还原能力,可以将多种铁的强螯合物还原^[17]. Chaney 等^[21]的实验发现,一些策略 I 植物能从 Fe^{3+} -HBED 强螯合物中吸收铁,而策略 II 型植物却不能. Parparova 等^[22]往藻类大量聚集的湖泊 Kinneret 中加入 8 羟基喹啉,发现能够大幅降低蓝藻的光合作用速率,但对绿藻的影响很小.

EDTA 是一种强螯合型有机配体,高浓度的 EDTA 能与铁形成较稳定的螯合物,可抑制 siderophores 的作用,但对 FCR 的还原作用影响较小.因此,笔者推测太湖分离的 2 种藻在铁限制条件

下,具有不同的铁の利用机制.铜绿微囊藻可能采取第 1 种利用机制,而四尾栅藻采取第 2 种利用机制.

太湖蓝藻水华优势种一般是微囊藻^[23~25],由于高密度的微囊藻水华和其分泌的藻毒素给湖泊水生生态、湖区人们的生活以及当地经济的发展都造成了很大的危害.而四尾栅藻不形成水华,也不分泌藻毒素,因此对环境危害相对较小.高浓度 EDTA 可强烈抑制蓝藻铜绿微囊藻而不抑制绿藻四尾栅藻,说明水体中铁的强有机配位体的增大可能会降低蓝藻水华发生的可能性.

3 结论

(1) 较高浓度 EDTA($\geq 13.5 \mu\text{mol/L}$)能够通过 与铁的络合,抑制蓝藻铜绿微囊藻的生长,而不抑制绿藻四尾栅藻,从而有利于四尾栅藻占据优势.

(2) 较高浓度 EDTA($\geq 13.5 \mu\text{mol/L}$)对铜绿微囊藻和四尾栅藻的影响不同可能与它们对于铁的吸收机制不同有关.

参考文献:

[1] Martin J H, Gordon R M, Fitzwater S E. The case for iron[J]. Limnology and Oceanography, 1991, **36**: 1793 ~ 1802.

[2] Van den Berg C M G. Evidence for organic complexation of iron in seawater[J]. Marine Chemistry, 1995, **50**: 139 ~ 157.

[3] Imai A, Fukushima T, Matsushige K. Effects of iron limitation and aquatic humic substances on the growth of *Microcystis aeruginosa* [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1999, **56**: 1929 ~ 1937.

[4] Nagai T, Imai A, Matsushige K, *et al.* Effect of iron complexation with dissolved organic matter on the growth of cyanobacteria in a eutrophic lake[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2006, **44**: 231 ~ 239.

[5] Murphy T P, Lean D R S, Nalewajko C. Blue-green algae: their excretion of iron-selective chelators enables them to dominate other algae[J]. Science, 1976, **192**: 900 ~ 902.

[6] Matz C J, Christensen M R, Bone A D, *et al.* Only iron-limited cells of the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* inhibit growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Canadian Journal of Botany, 2004, **82**: 436 ~ 441.

[7] Kerndorff H, Schnizer M. Sorption of metals on humic acid [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1980, **44**: 1701 ~ 1708.

[8] Steinberg C E W, Kamara S, Prokhot'skaya V Y, *et al.* Dissolved humic substances-ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? [J]. Freshwater Biology. 2006, **51**: 1189 ~ 1210.

[9] Sunda W G. Low iron requirement for growth in oceanic phytoplankton[J]. Nature, 1991, **351**(6321): 55 ~ 57.

[10] Pollinger Z, Kaplan B, Berman T. The impact of iron chelators on Lake Kinneret phytoplankton[J]. Journal of Plankton Research, 1995, **17**: 1977 ~ 1992.

[11] Gerringa L J A, Baar H J W, Timmermans K R. A comparison of iron limitation of phytoplankton in natural oceanic waters and laboratory media conditioned with EDTA[J]. Marine Chemistry, 2000, **68**: 335 ~ 346.

[12] Lammers P J, Sanders L J. Active transport of ferric schizokinen in *Anabaena* sp.[J]. The Journal of Bacteriology, 1982, **151**: 288 ~ 294.

[13] Wilhelm S W, Trick C G. Iron-limited growth of cyanobacteria: Multiple siderophore production is a common response[J]. Limnology and Oceanography, 1994, **39**: 1979 ~ 1984.

[14] Benderliev K M, Ivanova N I. High-affinity siderophore-mediated iron-transport system in the green alga *Scenedesmus incrassatulus* [J]. Planta, 1994, **193**: 163 ~ 166.

[15] Weger H G, Matz C J, Magnus R S, *et al.* Differences between two green algae in biological availability of iron bound to strong chelators [J]. Canadian Journal of Botany, 2006, **84**: 400 ~ 411.

[16] Allnutt F C T, Bonner W D J. Evaluation of reductive release as a mechanism for iron uptake from ferrioxamine B by *Chlorella vulgaris* [J]. Plant Physiology, 1987, **85**: 751 ~ 756.

[17] Eckhardt U, Buckhout T J. Iron assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* involves ferric reduction and is similar to Strategy I higher plants [J]. Journal of Experimental Botany, 1998, **49**: 1219 ~ 1226.

[18] Lynnes J A, Derzaph T L M, Weger H G. Iron limitation results in induction of ferricyanide reductase and ferric chelate reductase activities in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant (Heidelb), 1998, **204**: 306 ~ 365.

[19] Keshtacher L E, Hadar Y, Chen Y. Fe nutrition and utilization by green alga *Dunaliella bardawil* [J]. Plant soil, 1999, **215**: 175 ~ 182.

[20] Weger H G. Ferric and cupric reductase activities in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: experiments using iron-limited chemostats[J]. Plant (Heidelb), 1999, **207**: 377 ~ 384.

[21] Chaney R L. Plants can utilize iron from Fe-N, N-di-(2-hydroxybenzoyl)-ethylenediamine-N, N0-diacetic acid, a ferric chelate with 106 greater formation constant than Fe-EDDHA [J]. Journal of Plant Nutrition, 1988, **11**: 1033 ~ 1050.

[22] Parparova R, Yacobi Y Z. Chelatable iron in sub-tropical Lake Kinneret: its seasonal variation and impact on carbon uptake by natural algal assemblages and monoalgal cultures [J]. Aquatic Sciences, 1998, **60**: 157 ~ 168.

[23] 范成新. 太湖水体生态环境历史演变[J]. 湖泊科学, 1996, **8**: 297 ~ 304.

[24] Chen Y W, Qin B Q, Teubner K, *et al.* Long-term dynamics of phytoplankton assemblages: *Microcystis*-domination in Lake Taihu, a large shallow lake in China [J]. Journal of Plankton Research, 2003, **25**: 445 ~ 453.

[25] 秦伯强, 胡维平, 陈伟民. 太湖水环境演化过程与机理[M]. 北京: 科学出版社, 2004.