

[文章编号] 1007 - 7405(2004)01 - 0006 - 05

两种硝酸盐浓度下威氏海链藻和盐生杜氏藻 硝酸还原酶活力研究

吕嘉扬, 王大志, 洪华生, 黄邦钦

(厦门大学海洋环境科学教育部重点实验室, 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

[摘要] 把盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 和威氏海链藻 (*Thalassiosira weissflogii*) 培养在两种硝酸盐浓度下 (800 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$), 比较研究了它们在培养液中硝酸盐及亚硝酸盐的变化及细胞硝酸还原酶活力变动情况. 结果表明, 在两种硝酸盐浓度下, 两种微藻培养液中硝酸盐及亚硝酸盐的变化基本相同. 在高硝酸盐浓度下, 两种微藻培养液中的硝酸盐减少并维持较高的浓度, 且细胞叶绿素 a 含量较高; 而在低硝酸盐浓度下, 培养液中的硝酸盐在培养的第二天即被耗尽, 且细胞叶绿素 a 含量很低. 培养液中亚硝酸盐的变化在高浓度呈现逐渐增加的趋势, 而在低浓度则呈现先增加后减少的趋势; 两种微藻的硝酸还原酶活力在培养的第二天即达到最大值, 随后迅速下降并维持一低值, 但威氏海链藻的硝酸还原酶活力要略高于盐生杜氏藻. 本研究结果表明, 在不同硝酸盐浓度下藻类细胞内部的硝酸盐的吸收同化机制不同, 从而导致营养盐的变化也各不相同.

[关键词] 硝酸盐; 亚硝酸盐; 硝酸还原酶; 威氏海链藻; 盐生杜氏藻

[中图分类号] Q 178. 53

[文献标识码] A

0 引言

在海洋中, 氮是浮游植物生长繁殖所必需的营养元素, 在许多海区氮成了浮游植物生长的限制因子^[1,2]. 大量研究表明, 在许多海区硝酸盐是浮游植物氮的主要原料. 浮游植物可利用周围环境中的硝酸盐作为氮源, 经过一系列酶的还原作用, 将硝酸盐一步步转化成为氨氮后, 作为合成其它有机物质的原料^[3,4]. 在这些酶中, 硝酸还原酶 (Nitrate reductase, NR) 是最初始的酶, 它是一种诱导酶, 广泛存在于包括浮游植物在内的光合自养生物中, 可将硝酸盐 (NO_3^-) 还原成亚硝酸盐 (NO_2^-)^[3].

由于硝酸还原酶在浮游植物氮代谢中的重要作用, 在过去的 20 多年里, 围绕藻类硝酸还原酶开展了大量的工作. 已有的一些研究表明, 不同藻类硝酸还原酶特性是不同的, 这种差异也就导致了藻类对硝酸盐的利用效率的差异^[3]. 一些研究则发现, 浮游植物硝酸盐的吸收和还原常常是不一致的^[5~7]. Dortch 等的结果表明, 在某种条件下, 硝酸还原酶的活性与硝酸盐的同化率相似^[6], 而 Collos 等的研究结果则表明, 硝酸还原酶活力与细胞内硝酸盐浓度呈正相关^[8]. Leanne 等的研究则表明, 在以硝酸盐作为主要氮源的藻类中, 发现了高活性的和多变的硝酸还原酶活性^[4]. 此外, 硝酸还原酶活力还受到光^[9~10]、温度^[11]及昼夜节律^[12~13]等因子的影响. 有些研究人员则将硝酸还原酶活力的测定作为硝酸盐同化的定性标志和定量方法^[5,14]. 研究表明, 硝酸还原酶在海洋生态系统氮循环过程中占有极其重要的地位, 因而很有必要开展浮游植物硝酸还原酶方面的研究.

[收稿日期] 2004 - 01 - 10

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划资助项目 (2001CB409700)

[作者简介] 吕嘉扬 (1978 -), 男, 硕士, 从事环境科学研究.

本文将威氏海链藻 (*Thalassiosira weissflogii*) 和盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 两种海洋微藻培养在两种不同浓度的硝酸盐培养基中, 比较研究了培养基中硝酸盐、亚硝酸盐及硝酸还原酶活力的变化, 探讨了硝酸还原酶在藻类硝酸盐同化中的作用, 以期能为藻类的硝酸盐同化研究奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 藻种和培养

所用藻种威氏海链藻和盐生杜氏藻为本室保存种。所用培养基为 K- 培养基, 实验采用两种硝酸盐浓度, 分别为 800 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 。培养体积为 15 L, 光照强度 5 400 lx, 光暗比 LD = 14:10, 培养周期为 10 d。

1.2 培养液中硝酸盐和亚硝酸盐含量的测定

硝酸盐和亚硝酸盐的测定参照《海洋监测规范》^[15]。过滤海水样品经过铜-镉柱后, 将水样中的硝酸盐还原成亚硝酸盐, 用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法测定亚硝酸盐的含量, 进而得到硝酸盐的含量。亚硝酸盐可以直接加入显色剂后进行测定。

1.3 藻体叶绿素含量的测定

藻类叶绿素含量的测定采用分光光度法。取 15 mL 藻液过滤到 GF 滤膜上, 用 5 mL 90% 丙酮黑暗低温抽提 20 h 后离心, 上清液在 750 nm、664 nm、647 nm、630 nm 下测定吸光值。

1.4 硝酸还原酶的提取及其活性的测定

硝酸还原酶的提取及其活性的测定采用 Joseph 等的方法^[4]。样品加入 2 mL 抽提缓冲液后用超声波破碎并在 4 750 $\times\text{g}$ 下离心 5 min, 取上清液用于反应, 45 min 后加入 2 mL 500 mmol/L 的醋酸锌终止反应并将反应产物在 5 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液 2 mL 加 2 mL 显色剂显色 5 min, 在 540 nm 下测定吸光值。

2 实验结果

2.1 培养液中硝酸盐的变化情况

图 1 为培养液中硝酸盐浓度的变化情况。在高硝酸盐浓度培养条件下, 威氏海链藻培养液中硝酸盐浓度在整个生长过程中缓慢减少, 而盐生杜氏藻培养液中的硝酸盐浓度则在生长的前两天显著减少, 随后的几天里浓度基本不变。两种藻类培养液中硝酸盐的浓度变化幅度都在 250 $\mu\text{mol/L}$ 以上, 说明这两种微藻对硝酸盐的需求较高。在低浓度硝酸盐培养条件下, 两种微藻对硝酸盐的消耗情况较为相似, 培养液中的硝酸盐在生长的前两天即被基本耗尽, 在之后的时间内两种藻类都处于氮限制状态, 也进一步说明这两种藻类对氮的需求量较高。

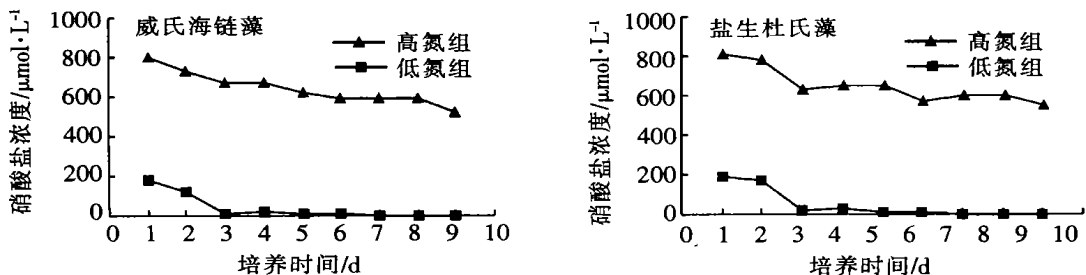


图 1 两种硝酸盐培养浓度下威氏海链藻和盐生杜氏藻培养液中硝酸盐含量的变化

2.2 培养液中亚硝酸盐的变化情况

图 2 是两种藻类培养液中亚硝酸盐的变化情况。结果表明, 在高浓度硝酸盐培养条件下, 两种微

藻培养液中亚硝酸盐的含量都呈一种缓慢增加的趋势,这主要是由于藻类细胞中大量的硝酸盐被还原成亚硝酸盐,造成细胞内亚硝酸盐供大于求,一些亚硝酸盐被藻细胞释放到水体中.在低浓度硝酸盐培养条件下,培养液中亚硝酸盐的变化则不同于高浓度硝酸盐培养液中的变化情况,亚硝酸盐含量呈现先增加后减少的变化规律,这是由于培养液中硝酸盐被藻类消耗以后,藻细胞利用培养液中的亚硝酸盐作为氮源,以提供细胞生长对氮的需求.

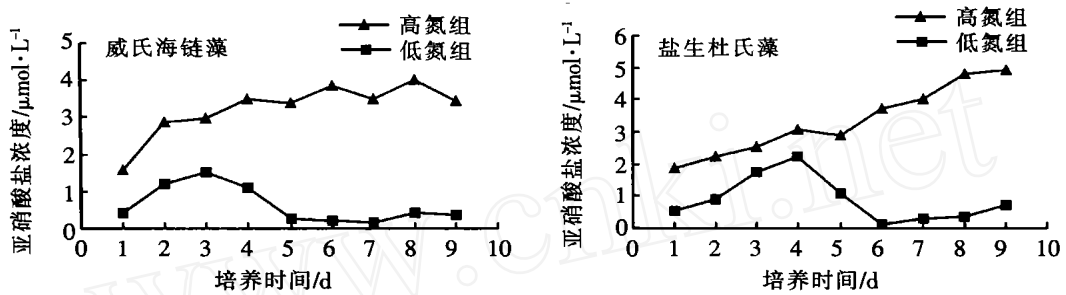


图 2 两种硝酸盐培养浓度下威氏海链藻和盐生杜氏藻培养液中亚硝酸盐含量的变化

2.3 两种微藻叶绿素 a 含量变化

两种微藻生长过程中叶绿素 a 含量的变化情况见图 3. 在高浓度硝酸盐培养条件下,两种微藻叶绿素 a 含量较高,最高可达 1 200 μg/L,且藻类的指数生长期也较长,而在低浓度硝酸盐条件下,藻类细胞中叶绿素 a 含量明显低于高浓度硝酸盐的相应组,特别是盐生杜氏藻,仅 400 μg/L,且藻类的指数生长期也较短.

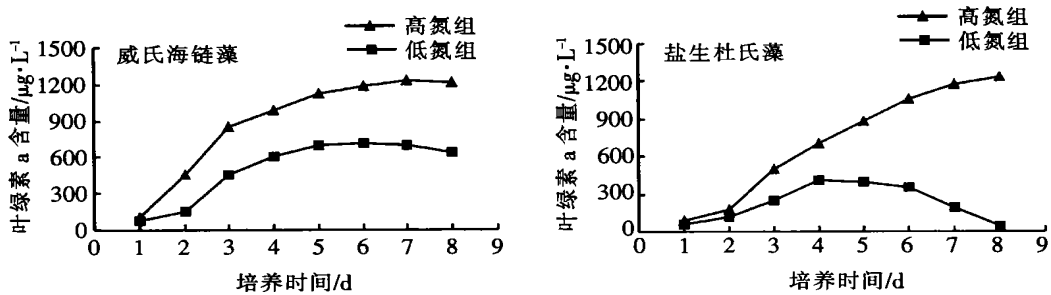


图 3 两种硝酸盐培养浓度下威氏海链藻和盐生杜氏藻细胞叶绿素含量的变化

2.4 两种微藻硝酸还原酶活力变化情况

图 4 为硝酸还原酶活力的变化情况. 结果表明,在高、低两种硝酸盐浓度下,两种微藻硝酸还原酶活力的变化趋势基本相似,即在接种后的第二天酶活力达到最大值,然后迅速下降并维持一较低的水平. 在高、低两种硝酸盐浓度下,两种微藻硝酸还原酶活力的最大值也相差不大,但威氏海链藻活力要略高于盐生杜氏藻,表明前者还原转化硝酸盐的能力可能会强于后者.

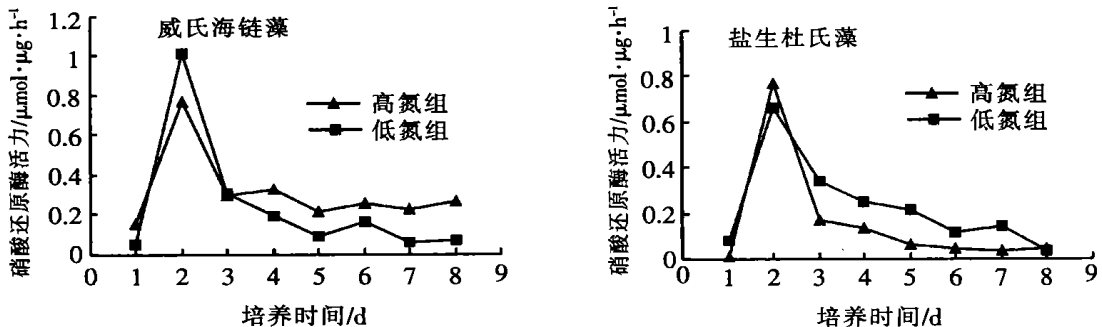


图 4 两种硝酸盐培养浓度下威氏海链藻和盐生杜氏藻硝酸还原酶活力的变化

3 讨论

研究结果表明, 在不同硝酸盐浓度下藻类培养液中的硝酸盐、亚硝酸盐的变化有所差异, 这可能是藻类对营养盐变动的一种适应机制. 在高硝酸盐浓度下, 硝酸盐的存在为藻类细胞生长提供了充足的氮源, 大量硝酸盐被吸收到细胞内并在硝酸还原酶的作用下还原成亚硝酸盐, 造成细胞内亚硝酸盐的过量累积, 部分被释放到培养液中, 导致培养液中亚硝酸盐浓度逐渐升高. 而在低硝酸盐浓度下, 尽管硝酸盐在生长的前期 (前两天) 并未成为生长的限制因子, 但随着培养时间的推移, 硝酸盐被消耗掉, 造成细胞内氮源不足, 为了维持细胞正常的生命活动, 细胞从周围环境中吸收亚硝酸盐作为氮源, 从而导致培养液中亚硝酸盐浓度的减少. 细胞内叶绿素含量的变化也反映了这一点. 在高硝酸盐浓度下, 微藻叶绿素 a 的含量较高且维持较长的指数生长期, 而在低硝酸盐浓度下, 两种微藻的叶绿素 a 含量较低且指数生长期也较短. 高浓度硝酸盐为细胞内叶绿素的合成提供了充足的含氮有机物和能量, 而硝酸盐的缺乏则抑制了细胞内叶绿素的合成.

硝酸还原酶是一种底物诱导酶, 当外界环境中存在硝酸盐时会受诱导而产生, 并在将硝酸盐转化成亚硝酸盐的过程中发挥重要作用. 尽管在硝酸盐吸收和硝酸还原酶活性的相关性方面开展了大量的工作, 但这些研究结果表明, 这两者之间的关系常常是不一致的^[5~7]. Dortch 等在中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 中发现, 在外界硝酸盐耗尽的过程中或耗尽后, 胞内储备硝酸盐的利用使藻类在外界极低的硝酸盐水平下仍维持很高的硝酸还原酶活性^[6]. Collos 也发现硝酸还原酶活性与胞内硝酸盐浓度的增加呈正相关^[5], 他们认为硝酸还原酶活力是导致胞内硝酸盐减少的主要原因, 而且在没有其他氮源被吸收的条件下, 外部酶活性与内部转化率相等. 一些研究则表明, 藻类硝酸还原酶活力主要受环境中各种无机氮的相对比率调控 (NO_3^-/N_i 或 NH_4^+/N_i), 而不是硝酸盐或铵盐的绝对浓度^[16]. 本实验结果表明, 在高、低两种硝酸盐浓度下, 盐生杜氏藻和威氏海链藻的硝酸还原酶活力差异不大, 且都在培养的第二天达到最大值, 后急速下降并维持一相对稳定的值, 这与上述的一些研究结果有所不同, 笔者认为, 任何藻类其细胞内的硝酸还原酶活力有一阈值, 它对应于某一硝酸盐浓度, 但当外界硝酸盐浓度达到其阈值时, 硝酸还原酶活力不会再增加. 此外硝酸还原酶活力与细胞内的硝酸盐和亚硝酸盐浓度也有关, 在生长初期, 硝酸盐被大量吸收到胞内, 诱导了细胞内硝酸还原酶, 硝酸还原酶活力呈现高值, 但大量硝酸盐的累积和亚硝酸盐的形成可能在一定程度上抑制了硝酸还原酶的活力, 导致其活力下降, 但仍维持在一个较低的水平, 以便将细胞内储备的硝酸盐继续还原为亚硝酸盐, 供细胞维持生长及其它生命活动, 这有待从细胞内部硝酸盐和亚硝酸盐含量的变化来进一步阐明.

[参考文献]

- [1] Ryther J H, Dunstan W M. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment [J]. Science, 1971, 171: 1008-1013.
- [2] McCarthy J J, Carpenter E J. Nitrogen cycling in near surface waters of the open ocean [A]. Carpenter E J, Capone D G (eds). Nitrogen in the marine environment [C]. New York: Academic Press, 1983, 487-512.
- [3] Berges J A, Hageman R H. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton [J]. Limnology & Oceanography, 1997, 40 (1): 82-93.
- [4] Leanne Joseph, Tracy A, Villareal, et al. A high sensitivity nitrate reductase assay and its application to vertically migrating *Rhizosolenia* mats [J]. Aquatic Microbial Ecology, 1997, 12: 95-104.
- [5] Collos Y, Slawyk G. Nitrate reductase activity as a function of in situ nitrate uptake and environment factors of euphotic zone profiles [J]. Exp Mar Biol Ecol, 1977, 29: 119-130.
- [6] Dortch Q, Ahmed S I, Packard T T. Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities in *Skeletonema costatum* as measures

- of nitrogen assimilation rates [J]. *Plankton Research*, 1979, 1: 169-186.
- [7] Blasco D, Maclsaac J J, Packard T T, et al. Relationship between nitrate reductase and nitrate uptake in phytoplankton in the Peru upwelling region [J]. *Limnology & Oceanography*, 1984, 29: 275-286.
- [8] Collos Y, Slawyk G. Significance of cellular nitrate content in natural population of marine phytoplankton growing in shipboard cultures [J]. *Mar Biol*, 1976, 34: 27-32.
- [9] Packard T T. The light dependence of nitrate reductase in marine phytoplankton [J]. *Limnology & Oceanography*, 1973, 18: 466-469.
- [10] Hersey R L, Swift E. Nitrate reductase activity of *Amphidinium carteri* and *Cachonina niei* (Dinophyceae) in batch culture: diel periodicity and effects of light intensity and ammonia [J]. *Phycol*, 1976, 12: 36-44.
- [11] Gao Y, Smith G J, Alberte R S. Nitrate reductase from the marine diatom *Skeletonema costatum* Biochemical and immunological characterization [J]. *Plant Physiol*, 1993, 103: 1437-1445.
- [12] Martinez R, Packard T T, Blasco D. Light effects and diel variations of nitrate reductase activity in phytoplankton from the north-west Africa upwelling region [J]. *Deep Sea Res*, 1987, 34, 741-753.
- [13] Ramalho C B, Hastings J W, Colepicolo P. Circadian oscillation of nitrate reductase activity in *Gonyaulax polyedra* is due to changes in cellular protein levels [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 225-231.
- [14] Eppley R W, Coatsworth J L, Solózano L. Studies of nitrate reductase in marine phytoplankton [J]. *Limnology & Oceanography*, 1969, 14: 194-205.
- [15] 国家海洋局. 海洋监测规范 [M]. 北京: 海洋出版社, 1991, 273-277.
- [16] Packard T T, Blasco D. Nitrate reductase activity in upwelling regions 2 Ammonia and light dependence [J]. *Tethys*, 1974, 6: 269-280.

Comparative Studies on Nitrate Reductase Activity of *Thalassiosira weissflogii* and *Dunaliella salina* Cultured in Two Nitrate Concentrations

LU Jia-yang, WANG Da-zhi, HONG Hua-sheng, HUANG Bang-qin

(Key Laboratory for Marine Environmental Science of the Ministry Education,
Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Two microalgae, *Thalassiosira weissflogii* and *Dunaliella salina* were grown in modified K-medium with two nitrate concentrations, 800 μ mol/L and 200 μ mol/L, variations of nitrate and nitrite in the culture mediums and nitrate reductase activity of cells were investigated comparatively. The results showed that variations of nitrate and nitrite in the culture mediums of two algae under two nitrate concentration were almost same: nitrate concentration in the culture mediums of two algae decreased slowly in the culture with high nitrate concentration, and chlorophyll a contents of cells were very high; however, nitrates in the culture mediums were exhausted within the second growth day in the culture with low nitrate concentrations and chlorophyll a contents were very low. Nitrite concentration in the culture mediums increased slowly in the culture with high nitrate concentration while it increased within the first two days then decreased in the culture with low nitrate concentration. Nitrate reductase activity of two microalgae peaked in the second growth day and decreased sharply and maintained a relatively low stable level, however NR of *T. weissflogii* was higher than that of *D. salina*. The results indicate that the uptake and assimilation mechanisms of nitrate in cells are different in the culture with different nitrate concentrations, which result in nutrient varied greatly.

Key words: nitrate; nitrite; nitrate reductase; *Thalassiosira weissflogii*; *Dunaliella salina*