

浒苔对不同氮源吸收特性的初步研究

吴婷¹, 田小亭¹, 刘召辉¹, 石晓勇¹, 史华明²

(1. 中国海洋大学 化学化工学院, 山东 青岛 266100; 2. 国家海洋局 南海工程勘察中心, 广东 广州 510300)

摘要: 采用 Michaelis-Menten 动力学方法, 研究了浒苔对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 吸收利用关系。结果显示, 浒苔对三种不同氮源的 K_s (表观米氏常数) 大小顺序为: $\text{NO}_3\text{-N} > \text{NH}_4\text{-N} > \text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 表明浒苔对有机氮的亲合力大于对无机氮的亲合力, 且对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的亲合力大于其对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的亲合力; 浒苔对三种不同氮源的最大吸收速率顺序为: $\text{NO}_3\text{-N} > \text{NH}_4\text{-N} > \text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 表明浒苔对氮源的吸收潜力由大到小依次为 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 。

关键词: 氮源; 浒苔; 吸收动力学; 米氏方程

中图分类号: P734.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)04-0051-04

2008年6月, 大量浒苔受风力、海流等因素的影响, 从黄海中部漂移至青岛近海海域, 6月中、下旬, 浒苔区已靠近胶州湾口奥帆赛区海域附近, 且覆盖密度明显增大, 6月25日浒苔面积达 800 km^2 ^[1]。其聚集规模之大、持续时间之长, 十分罕见, 酿成了一场突如其来的自然灾害——绿潮。有研究表明, 大面积绿潮爆发的主要原因是海水富营养化、氮磷比失衡和适宜的环境气候条件等^[2]。浒苔生长需要丰富的营养盐条件, 对氮的需求很高^[3]。鉴于中国此前缺乏对浒苔发生机制、过程等方面的研究和探讨, 本文通过以 NaNO_3 、 NH_4Cl 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 分别作为唯一外加氮源的实验室培养实验, 研究了3种不同氮源条件下浒苔对氮的吸收动力学, 分析了浒苔对不同氮源的响应, 可为深入探讨青岛近海海域富营养化与浒苔爆发之间的关系提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所用的浒苔藻种于2008年6月采自青岛市大麦岛码头, 从中挑选若干生长状况良好的藻体, 经消毒海水冲洗去除泥污和附生生物后, 于中国海洋大学化学化工学院海洋污染生态化学重点实验室藻种室进行扩大培养。培养介质为 $f/2$ 培养液。

取生长良好的浒苔接种至未外加氮源的 $f/2$ 培养液中, 饥饿培养48 h, 此时培养液中原有氮源已几乎完全被浒苔吸收消耗。培养条件为: 温度 $(18 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 光照强度 $3\ 000 \sim 4\ 000 \text{ lx}$, 光照周期 L : D 为

12 : 12^[4]。

1.2 实验方法

在 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 的吸收动力学实验中, NaNO_3 、 NH_4Cl 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 分别作为唯一的外加氮源。相关研究表明, 浮游植物细胞利用有机氮时的氮磷比比利用无机氮时的大很多^[5], 实验据此设计培养液氮源梯度(表1), 其余组分参照 $f/2$ 培养液添加。将经过48 h 氮饥饿培养的浒苔从培养瓶中取出, 经消毒海水冲洗, 分别接种于1 L 玻璃三角烧瓶

表1 培养液氮源浓度及取样时间

Tab. 1 Nitrogen concentrations of *Enteromorpha prolifera* culture and sampling schedule

氮源	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	取样时间
$\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ (N/P=16)	10, 20, 40,	0, 15 min, 30 min,
	80, 160	1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h,
$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (以 N 计, P 按 $f/2$ 浓度加入)	30, 60, 120	0, 30 min, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h

收稿日期: 2010-04-01; 修回日期: 2010-07-23

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2010CB428701); 中国海洋大学 SRTP 项目(0811010308)

作者简介: 吴婷(1986-), 女, 山西太原人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋营养盐循环动力学, 电话: 15966920516, E-mail: zhghydxwt@126.com; 石晓勇, 通信作者, 电话: 0532-66782143, E-mail: shixy@ouc.edu.cn

中, 浒苔的初始接种量为 0.5 g/L, 接种时间为上午 10 点。全部实验均设置两个平行组, 按表 1 取样时间分别从三角烧瓶中取 10 mL 样品, 过滤(GF/F 膜, 450 灼烧 4 h), -20 下冷冻保存, 测定样品中氮源浓度。

营养盐 NO₃-N、NH₄-N 的测试在 BRAN+LUEBBEAA3 营养盐自动分析仪上完成, CO(NH₂)₂ 的测定采用二乙酰一肟法^[6], 该方法相对标准偏差为 0.5%。

采用 Michaelis-Menten 动力学方程的 Hofstee 转化式处理实验数据, 可得出吸收动力学参数 V_{max}(最大吸收速率)和 K_s(表观米氏常数)。该方程可以定量描述稳态时藻类对营养盐的吸收速率和外部营养盐浓度的关系。方程的具体形式为:

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

其中, K_s 为吸收速率为最大吸收速率的一半时外界离子浓度, 1/K_s 表征吸收系统的亲和力, K_s 值越小, 说明浒苔对该离子的亲和能力越大。V_{max} 为吸收所能达到的最大速率, V_{max} 值越大, 表示吸收的潜力越大^[7]。

2 结果与讨论

2.1 浒苔对氮源的吸收特征

图 1 和图 2 分别是培养液 NO₃-N 和 NH₄-N 含量变化曲线。结合图 1 和图 2 可知, 无机氮浓度随着时间增加而逐渐降低, 并且吸收率逐渐降低。原因可能是当浒苔处于氮限制时, 细胞内的氮库较小; 起初对氮源的快吸收用于充盈细胞内营养库; 随后吸收率下降至稳定阶段则可能是充盈的细胞内氮库的反馈抑制作用; 接着是由介质营养盐浓度控制的吸收, 随着介质营养盐的消耗吸收率迅速下降^[8]。实验结果还表明, NO₃-N 和 NH₄-N 变化趋势大体一致: NO₃-N 浓度为 10、20、40、80 和 160 μmol/L 时分别在第 6、12、24 和 48 小时基本降为 0; NH₄-N 浓度为 10、20、40 和 80 μmol/L 时分别在第 3、24、24 和 48 小时基本降为零, 而 160 μmol/L 在 48 h 时只降低至 40 μmol/L 左右。由此可见, NH₄-N 浓度下降较 NO₃-N 慢。

图 3 是培养液 CO(NH₂)₂ 含量变化曲线。由图 3 可知, CO(NH₂)₂ 浓度随着时间增加呈波动状态, 但整体趋势降低。在 8~24 h 之间三种浓度梯度曲线都出现平台期, 且均在 24、36 h 出现波峰, 在 30 h 出现波谷。浓度为 30、120 μmol/L 时曲线变化趋势基

本相同, 几乎在相同时刻出现波峰或者波谷, 浓度为 60 μmol/L 时, 曲线在 36 h 后波动范围很小。浓度为 30、60 μmol/L 时, 分别在第 42、60 小时之后 CO(NH₂)₂ 浓度开始维持在一个很低的水平, 浓度为 120 μmol/L 时, 在 96 h CO(NH₂)₂ 浓度降至 15 μmol/L 以下。与图 1、2 对比可知, 相对对无机氮的吸收, 0~

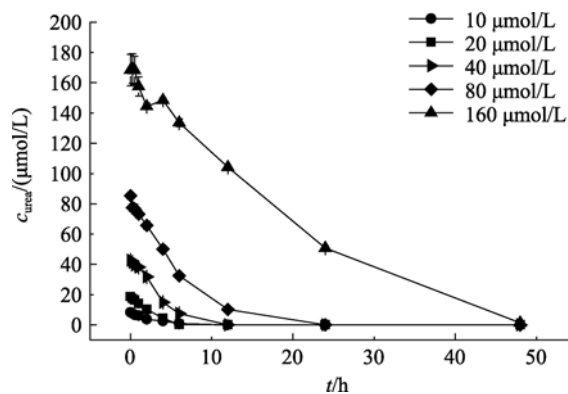


图 1 培养液 NO₃-N 含量变化曲线

Fig. 1 Variation of the concentration of NO₃-N in culturing *Enteromorpha prolifera*

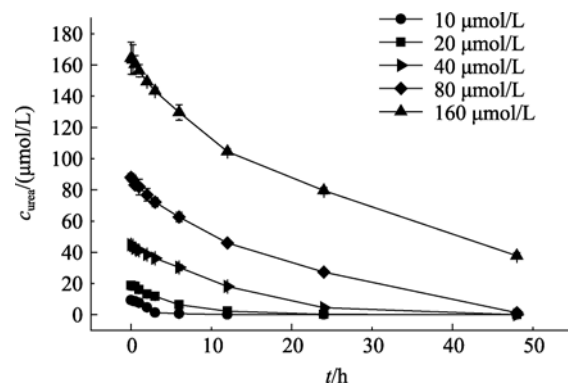


图 2 培养液 NH₄-N 含量变化曲线

Fig. 2 Variation of the concentration of NH₄-N in culturing *Enteromorpha prolifera*

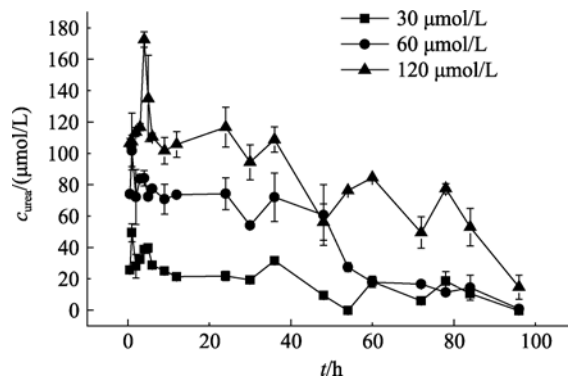


图 3 培养液 CO(NH₂)₂ 含量变化曲线

Fig. 3 Variation of the concentration of CO(NH₂)₂ in culturing *Enteromorpha prolifera*

20 h 内, 浒苔对 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 吸收呈剧烈波动; 20 h 后 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 浓度波动递减, 可能原因是, 在 20 h 前由于细胞不能直接利用有机氮^[9], 在氮饥饿状态下起始阶段吸收的氮超过生长所需要的量, 这是浒苔对外界环境中营养盐变化的适应; 20 h 后白天浮游植物的光合作用吸收 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 而夜晚的呼吸作用利用氧气, 将部分 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 还给海水。这与黄海围隔实验结论一致^[10]。

2.2 浒苔对氮源的吸收动力学研究

实验结果表明: 随着溶液中三种氮源浓度的增加, 浒苔对其吸收速率不断增大。按照 Michaelis-Menten 动力学方程拟合, 得到浒苔对三种氮源吸收的最大速率(V_{\max})和表观米氏常数(K_s)(表 2)。可知浒苔对于三种不同氮源的吸收 K_s 大小顺序为 $\text{NO}_3\text{-N} > \text{NH}_4\text{-N} > \text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 最大吸收速率 V_{\max} 值顺序为 $\text{NO}_3\text{-N} > \text{NH}_4\text{-N} > \text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 。

对于两种无机氮源, 浒苔对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的亲合力大于其对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的亲合力(K_s 值越大, 亲合力越小), 这一结果在理论上证实了一些学者关于绿藻“优先吸收净化 $\text{NH}_4\text{-N}$ ”的推断^[11]。对于大型海藻优先吸收 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的原因, Flynn^[12]的解释得到多数人的认可: Flynn 从能量学的角度出发, 首先考虑到两种离子各自传递和同化过程的不同, 假设氮源以带正电荷的化合物形式与 Na^+ 一起通过带负电荷的细胞膜电位而被传递, 同时 K^+ 外流, 以维持细胞膜的电位平衡, 而 Na^+/K^+ 泵则又重新建立起电子梯度。如果该假设成立, 则海藻藻体对 NO_3^- 的吸收利用要比 NH_4^+ 耗费

更多的能量, 造成能量浪费。实验结果还表明, 浒苔对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的吸收潜力大于其对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸收潜力 (V_{\max} 值越大, 表示吸收的潜力愈大)。这与浮萍吸收 $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的动力学研究实验结果相符^[13], 可能与高浓度 $\text{NH}_4\text{-N}$ 条件下氨对浮萍的毒害作用有关^[14]。

浒苔对 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 的亲合力远大于两种无机氮源, 吸收潜力远小于两种无机氮源。可能原因是 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 中氮为还原态^[15], 而 $\text{NO}_3\text{-N}$ 中的氮呈高氧化态, 所以 $\text{NO}_3\text{-N}$ 在参与代谢时, 必须经历一个还原过程。细胞氮的代谢中, 必须以氨的形式与细胞内的碳水化合物衍生的酮酸相作用生成氨基酸, 然后生成蛋白质。浒苔以 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 为氮源时, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 将在尿素酶的催化下, 分解成氨和 CO_2 , 进一步被利用^[16]。

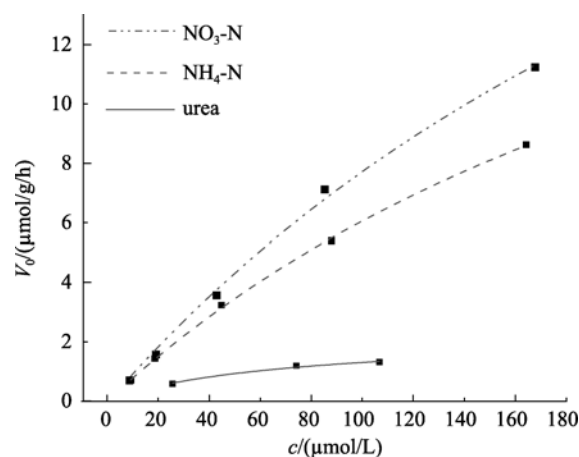


图 4 浒苔吸收氮源速率与溶液中氮源浓度关系

Fig. 4 The relationship between the absorption rates of nitrogen by *Enteromorpha prolifera* and the concentrations of various nitrogen species

表 2 各种氮源对浒苔生长影响的 V_{\max} 和 K_s

Tab. 2 V_{\max} and K_s value of *Enteromorpha prolifera* in absorbing different nitrogen species

氮源	V_{\max} ($\mu\text{mol/g/h}$)	K_s ($\mu\text{mol/L}$)	R^2	方程
$\text{NO}_3\text{-N}$	35.79	364.17	0.9974	$V=35.79S/(364.17+S)$
$\text{NH}_4\text{-N}$	26.57	306.33	0.9995	$V=26.57S/(306.33+S)$
$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	2.680	72.750	0.9885	$V=2.68S/(72.75+S)$

3 结论

浒苔对氮源的吸收动力学研究实验和分析结果表明, 浒苔对无机氮和有机氮的吸收存在明显的差异, 浒苔对有机氮的亲合力大于对无机氮的亲合力, 且对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的亲合力大于其对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的亲合力; 浒苔对无机氮的最大吸收速率明显大于对有机氮的最大吸收速率, 且对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的最大吸收速率大于对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的最大吸收速率, 说明当介质中氮浓度较高

时, 浒苔对氮源净化速率顺序为 $\text{NO}_3\text{-N} > \text{NH}_4\text{-N} > \text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 。

参考文献:

[1] 李德萍, 杨育强, 董海鹰, 等. 2008 年青岛海域浒苔大爆发天气特征及成因分析[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(6): 1165-1170.

[2] 夏斌, 马绍赛, 崔毅, 等. 黄海绿潮(浒苔)暴发区温盐、溶解氧和营养盐的分布特征及其与绿潮发生的关系

- 系[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 94-101.
- [3] 李瑞香, 吴晓文, 韦钦胜, 等. 不同营养盐条件下浒苔的生长[J]. 海洋科学进展, 2009, 27(2): 211-214.
- [4] 张寒野, 吴望星, 宋丽珍, 等. 条浒苔海区试栽培及外界因子对藻体生长的影响[J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 781-786.
- [5] 张青田. 环境因子对海洋微藻增殖的影响研究[D]. 青岛: 青岛海洋大学硕士学位论文, 2002, 1-81.
- [6] 王富平. 二乙酰一胍法测定盐藻养殖卤水中的尿素[J]. 海湖盐和化工, 1994, 23(3): 5-9.
- [7] Droop M R. 25 years of algal growth kinetics: a personal view[J]. Bot Mar, 1983, 26: 99-112.
- [8] Mc Glathery K J. Changes in intracellular nitrogen pools and feedback controls on nitrogen uptake in *Chaetomorpha linum*[J]. J Phycol, 1996, 32(3): 393-401.
- [9] 徐立. 有机氮化合物对海洋浮游植物生长的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1995, 34(5): 824-828.
- [10] 侯继灵. 不同氮源和铁对浮游植物生长影响的围隔实验研究[D]. 青岛: 中国海洋大学研究生学位论文, 2006.
- [11] Caicedo J R, van der Steen N P, Arce O, et al. Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rate of duckweed (*Spirodela polyrrhiza*)[J]. Water Research, 2000, 34(15): 3 829-3 835.
- [12] Flynn K J. Algal carbon-nitrogen metabolism: A biochemical basis for modelling the interactions between nitrate and ammonium uptake[J]. Journal of Plankton Research, 1991, 13(2): 373-387.
- [13] 沈根祥, 姚芳, 胡宏, 等. 浮萍吸收不同形态氮的动力学特性研究[J]. 土壤通报, 2006, 37(3): 505-506.
- [14] 种云霄, 胡洪营, 钱易. 无机氮化合物及 pH 值对紫背浮萍生长的影响[J]. 中国环境科学, 2003, 23: 417-421.
- [15] Syrett P J. Nitrogen metabolism of microalgae[J]. Can Bull Fish Aquat, 1981, 210: 182-210.
- [16] 陈慈美, 郑爱榕, 周慈由, 等. 铁对中肋骨条藻生长、色素化程度及氮同化能力的影响[J]. 海洋学报, 1997, 19(3): 50-56.

Absorption of different nitrogen species by *Enteromorpha prolifera*

WU Ting¹, TIAN Xiao-ting¹, LIU Zhao-hui¹, SHI Xiao-yong¹, SHI Hua-ming²

(1. College of Chemistry and Chemical engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China;
2. South China Sea Marine Engineering Surveying Center State Oceanic Administration, Guangzhou 510300, China)

Received: Apr., 1, 2010

Key words: nitrogen source; *Enteromorpha prolifera*; absorption kinetics; Michealis equation

Abstract: A large scale of *Enteromorpha prolifera* tide occurred in the coastal area of Qingdao in 2008 utilizations of $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ by *Enteromorpha prolifera* and the absorption kinetics of Michaelis-Menten were studied in this paper. The apparent Michaelis constant K_s for various nitrogen species followed the order of $\text{NO}_3\text{-N} > \text{NH}_4\text{-N} > \text{CO}(\text{NH}_2)_2$, indicating that *Enteromorpha prolifera* has affinity to organic nitrogen than to inorganic nitrogen. In addition, V_{\max} for various nitrogen species followed the order of $\text{NO}_3\text{-N} > \text{NH}_4\text{-N} > \text{CO}(\text{NH}_2)_2$, indicating that the order of *Enteromorpha prolifera* absorbing potential on different types of nitrogen is $\text{NO}_3\text{-N} > \text{NH}_4\text{-N} > \text{CO}(\text{NH}_2)_2$.

(本文编辑: 康亦兼)