

# 氮磷营养盐对中肋骨条藻生长及硝酸还原酶活性的影响

王金花, 唐洪杰, 杨茹君, 王修林

(中国海洋大学 化学化工学院, 海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 海洋污染生态化学实验室, 山东 青岛 266100)

**摘要:** 通过实验室培养, 在不同氮磷浓度及氮磷比率的营养条件下, 对中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 的生长及藻细胞硝酸还原酶的活性进行研究。实验结果表明, 中肋骨条藻属于营养型藻类, 氮磷营养盐的添加, 极大地促进了藻细胞的增殖。在接种后的第 4~5 天, 各培养组藻密度达到最大值并与对照组形成极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。实验进一步发现, 环境中的氮、磷浓度及氮磷比率都会影响中肋骨条藻的生长及藻细胞硝酸还原酶活性 (NRA)。此外, 在各培养组中, 中肋骨条藻硝酸还原酶活性的最大值 ( $NRA_{max}$ ) 均出现在指数生长期 (接种后第 1, 2 天), 早于最大藻密度的出现时间 (第 4, 5 天), 这表明藻对营养盐的同化速率与生长速率并不一致, 后者存在一定的滞后效应。在本实验条件下, 中肋骨条藻的硝酸还原酶活性存在一定的阈值。

**关键词:** 硝酸盐; 磷酸盐; 中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*); 硝酸还原酶; 硝酸还原酶活性; 比生长率  
中图分类号: S941.42 文献标识码: A 文章编号: 100023096(2008)12006405

营养盐是海洋浮游植物生长所必需的成分, 研究表明, 营养盐要经过一系列酶的转化作用才能最终被浮游植物吸收利用。其中, 存在于细胞质的硝酸还原酶 (EC. 1. 6. 6. 1, 缩写 NR) 是硝酸盐同化过程中的限速酶, 处于植物氮代谢的关键位置, 其活力大小直接影响了硝酸盐的生物利用度, 在海洋生态系统氮循环过程中占有极其重要的地位<sup>[1~4]</sup>。

中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 是隶属于硅藻门 (Bacillariophyta) 圆筛藻目 (Coscinodiscales) 骨条藻科 (Skeletonemaceae) 骨条藻属 (*Skeletonema*) 的一种单细胞浮游植物, 该藻具有广温广盐的生活习性, 在很多海域大量繁殖并形成赤潮, 从而引起了国内外海洋工作者的广泛关注。其中, 有些学者围绕营养盐对该藻的影响进行了多次研究, 如: 李铁等<sup>[5~7]</sup> 先后对中肋骨条藻吸收磷酸盐和硝酸盐的半饱和常数以及藻体氮磷含量变化进行了测定; 杨登峰、李金涛等<sup>[8,9]</sup> 也分别测定了不同磷酸盐和硝酸盐浓度下中肋骨条藻的生长速率; 候继灵等<sup>[10]</sup> 采用围隔生态的实验方法测定了在不同磷酸盐浓度下中肋骨条藻密度的变化情况。除此之外, 也有学者针对中肋骨条藻藻细胞 NR 测定方法及活性进行了探讨, 如, Dortch 等<sup>[11]</sup> 在对中肋骨条藻硝酸还原酶活性 (NRA) 的研究中发现, 细胞内的硝酸盐储备可使该藻在外界硝酸盐水平极低的情况下, 维持较高的酶活性; 随后, 又有学者<sup>[4, 12, 13]</sup> 以中肋骨条藻为实验对象, 考察了藻细胞 NRA 的测定方法及 NR 的某些特性。虽然围绕中肋骨条藻开展的研究比较多, 但是在不同营养盐条件下, 对该藻同时进行硝酸还原酶活性和藻细胞生长状况的报道比较少见。本实验

设定了不同的氮磷浓度及比例, 对不同营养盐环境中中肋骨条藻的生长及 NRA 变化进行同步监测, 以期通过酶活力揭示营养盐对该藻生长的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验藻种及培养

采用实验室单种一次培养法 (Guillard, 1962), 具体培养条件为: 温度 20 e ? 1 e, 明暗周期 12 h B 12 h, 光源为白色日光灯, 光照强度约为 40 Lmol / ( m<sup>2</sup> # s)。在整个培养过程中, 各操作步骤均进行灭菌处理。

实验所用藻种为中国海洋大学海洋污染生态化学实验室保存种。实验藻种所用培养液的配置: 取一定体积的天然海水, 过滤后将滤液置于高压锅中煮沸消毒, 静置冷却, 然后将海水移至试剂瓶 (采用蒸汽灭菌器于 121 e 加热 20 min 进行湿热灭菌) 中, 按照 f / 2 营养液的配方配制培养基 (氮磷浓度按需要配置), 并用 1 mol / L HCl 溶液调节 pH 值至 8.1 左右。实验时, 取适量处于指数生长期、生长状况良好的藻液, 分别接种于 5 L PET 桶中, 进行实验室单种一次性培养, 初始接种密度约为 3.1 @10<sup>4</sup> 个 / mL, 培养时间 10 d 左右。取样过程中, 各操作步骤均进行灭菌处理。

收稿日期: 200711220; 修回日期: 200804205

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40376033); 国家重点基础研究发展计划项目 (2005CB422305)

作者简介: 王金花 (1982), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋污染生态, E2mail: wjh8212@126.com; 王修林, 通讯作者: E2mail: xlwang@ouc.edu.cn

## 1.2 N、P 浓度及 N/P 的设置

在培养液初始 N、P 浓度分别固定为  $\text{NO}_3\text{2N}$  为  $176 \text{ Lmol/L}$ ,  $\text{PO}_4\text{2P}$  为  $7.2 \text{ Lmol/L}$  的条件下, 通过表 1 各培养组中的 N、P 浓度及 N/P

Tab. 1 N、P concentrations and N/P ratios in different tested groups

项目	浓度(Lmol/L)									
	P 固定组					N 固定组				
$\text{NO}_3\text{2N}$	0	57.6	115.2	230.4	460.8	176	176	176	176	176
$\text{PO}_4\text{2P}$	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	22	11	5.5	2.75	0
N/P	-	8	16	32	64	8	16	32	64	-

## 1.3 藻密度的测定及比生长率的计算

从接种第 2 天起, 每隔 24 h 取样, 使用 Lugols 试剂固定后于显微镜(OLYMPUS BH22)下进行藻细胞密度计数。藻细胞的比生长速率依下列公式计算:  $L = (\ln N - \ln N_0) / (t - t_0)$ 。L 为比生长速率, N、 $N_0$  分别为  $t$ 、 $t_0$  时刻的细胞数,  $t$ 、 $t_0$  为不同的培养时间。

## 1.4 硝酸还原酶活性的测定

硝酸还原酶活性(缩写 NRA)的测定方法参考 Berges<sup>[13]</sup> 以及唐洪杰等<sup>[4]</sup> 优化的离体法进行。过滤收集藻细胞于 GF/F 膜上, 加入 1 mL 酶提取液, 冰浴中经匀浆器研磨后, 于 4 e 条件下离心, 上清液即为硝酸还原酶粗提液。取 0.3 mL 酶粗提液, 在 25 e 保温反应, 酶促反应时间约为 25 min, 之后加入 2 mL 醋酸锌溶液终止反应。酶活力以单个藻细胞单位时间内生成的  $\text{NO}_2\text{2N}$  量表征。其中  $\text{NO}_2\text{2N}$  生成量采用磺胺 2 $\Delta$ 萘乙二胺显色分光光度法测定, 于 540 nm 下测定吸光值( $A_{540}$ )。

## 2 结果及讨论

### 2.1 硝酸盐和磷酸盐对中肋骨条藻生长的影响

在培养液初始磷酸盐浓度相同的条件下, 不同硝酸盐浓度对中肋骨条藻生长的影响如图 1a 所示。由图 1 可知, 各培养组藻细胞在接种后第 2 天即进入指数生长期, 但未添加  $\text{NO}_3\text{2N}$  的空白组藻密度增加相对较小。在接藻后的第 4、5 天各培养组的藻密度分别达到了最大值, 之后藻细胞逐渐进入衰亡阶段。通过计算指数生长期的平均比生长率(图 2)

改变 P 或者 N 的浓度设定 5 个 N/P 梯度: 0, 8, 16, 32, 64, 以考察在不同氮磷浓度及比率的环境中中肋骨条藻的生长状况。具体浓度设置见表 1。

和培养期间的最大藻密度发现, 随着培养液中硝酸盐浓度的增加, 藻细胞的平均比生长速率和最大藻密度都不断增大, 当  $\text{NO}_3\text{2N}$  浓度为  $460.8 \text{ Lmol/L}$  时, 平均比生长率最大, 约为  $0.67 \text{ d}^{-1}$ , 藻密度也达到最大值, 是空白培养组的 3 倍多。该组添加的 N/P 比率为 64 B1, 说明在实验设定的 N/P 范围内, 固定培养液初始  $\text{PO}_4\text{2P}$  浓度为  $7.2 \text{ Lmol/L}$  时, 中肋骨条藻生长的最适 N/P 比率为 64 B1。对各个  $\text{NO}_3\text{2N}$  浓度梯度下中肋骨条藻的最大细胞密度平均值进行统计学分析, 结果表明, 添加  $\text{NO}_3\text{2N}$  的各培养组最大细胞密度与空白组差异极显著( $P < 0.01$ ), 说明添加硝酸盐后促进了中肋骨条藻的生长。

固定培养液初始硝酸盐浓度, 不同磷酸盐浓度对中肋骨条藻生长的影响如图 1b 所示。同图 1a 中的各培养组一样, 中肋骨条藻在接种后第 2 天也进入了指数生长期, 未添加  $\text{PO}_4\text{2P}$  的空白组藻细胞增加相对较少, 最大藻密度大约只有  $\text{PO}_4\text{2P}$  浓度  $11 \text{ Lmol/L}$  培养组的 1/4。此外, 当  $\text{PO}_4\text{2P}$  浓度为  $11 \text{ Lmol/L}$  时, 藻细胞在指数生长期的平均比生长率也有最大值(图 2), 约为  $0.69 \text{ d}^{-1}$ , 该组添加的 N/P 比为 16 B1, 说明在固定培养液初始  $\text{NO}_3\text{2N}$  浓度为  $176 \text{ Lmol/L}$  的实验条件下, N/P = 16 B1 更适合中肋骨条藻的生长。对各个  $\text{PO}_4\text{2P}$  浓度梯度下中肋骨条藻的最大细胞密度均值统计分析表明, 添加  $\text{PO}_4\text{2P}$  的培养组最大细胞密度与空白组存在极显著性差异( $P < 0.01$ ), 说明添加磷酸盐后促进了中肋骨条藻的生长。

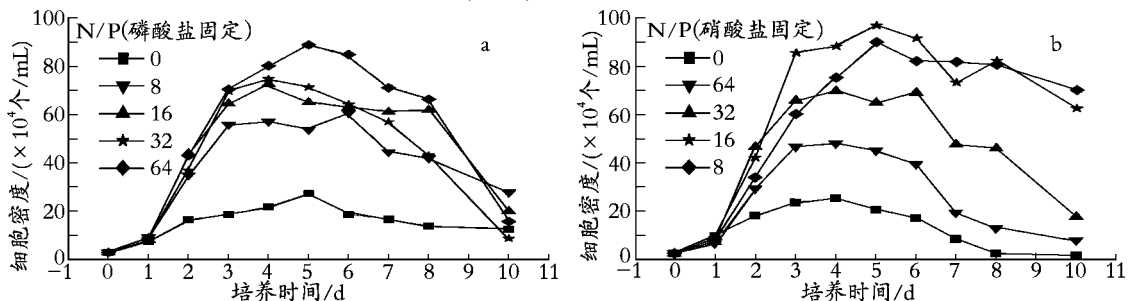


图 1 中肋骨条藻生长曲线

Fig. 1 The growth curves of *S. costatum*

a. 不同硝酸盐浓度下中肋骨条藻的生长曲线; b. 不同磷酸盐浓度下中肋骨条藻的生长曲线

a. The growth curves of *S. costatum* under different nitrate concentrations; b. The growth curves of *S. costatum* under different phosphate concentrations

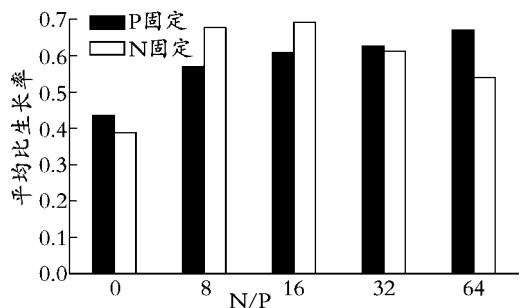


图2 不同 N/P 条件下的平均比生长率

Fig. 2 The average specific growth rate in different N/P ratios

曾经有学者<sup>[14]</sup>提出,藻细胞的生长特性与环境中的营养盐浓度以及 N/P 比值密切相关。对比图 1 中肋骨条藻生长曲线也可以发现此规律,即 N、P 浓度及 N/P 比率均影响该藻的生长,且添加硝酸盐和磷酸盐后可以极大地促进藻细胞的增殖,因此,按照有些学者<sup>[15]</sup>的分类方法,可将该藻划分为营养型藻类。此外,由于初始营养环境的不同,各组的最大藻密度有所差异,指数生长期平均比生长率越大,藻密度就越大。但是,藻生长曲线整体变化趋势相似:短暂的指数生长后,几乎没经过平台期的生长即进入了衰亡阶段。此实验结果与吕颂辉等<sup>[16]</sup>的结论一致:中肋骨条藻具有/快起快落0的生长模式,在生活策略上可划分为 r2策略者。

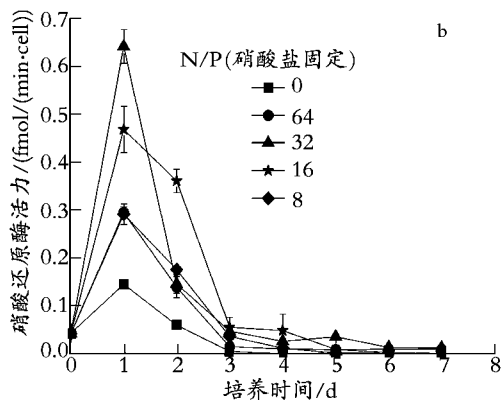
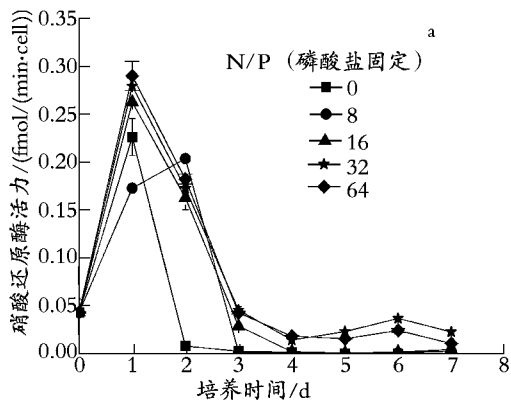


图3 中肋骨条藻 NRA 随培养时间的变化

Fig. 3 The change of NRA with the culture time of *S. costatum*

a. 不同硝酸盐浓度下, NRA 随培养时间的变化; b. 不同磷酸盐浓度下, NRA 随培养时间的变化

a. the change of NRA with the culture time under different nitrate concentrations; b. the change of NRA with the culture time under different phosphate concentrations

硝酸还原酶是一种底物诱导酶,酶活力受底物硝酸盐的诱导而产生,但由于硝酸盐进入到细胞内的运输过程需要消耗 ATP,而磷酸盐的浓度大小影响着 ATP 的合成<sup>[2, 20]</sup>,因此,藻类硝酸还原酶在一定程度上也受磷酸盐的制约。图 3b 为固定培养液初始 NO<sub>3</sub>N 浓度为 176 Lmol/L,在不同 PO<sub>4</sub>P 浓度条件下,中肋骨条藻 NRA 随培养时间变化图。同图 3a 的变化趋势类似,各培养组酶活力在接藻后第

## 2.2 硝酸盐和磷酸盐对中肋骨条藻 NRA 的影响

固定培养液初始 PO<sub>4</sub>P 浓度为 7.2 Lmol/L,在不同 NO<sub>3</sub>N 浓度条件下,中肋骨条藻 NRA 随培养时间变化如图 3a 所示。结果表明,在不同硝酸盐浓度下,中肋骨条藻 NRA 变化趋势相似,即接藻后,藻细胞的酶活力迅速增大,并在第一天或者第二天相继达到了各培养组酶活力的最大值,随后酶活力值迅速降低,尤其是 NO<sub>3</sub>N [115.2 Lmol/L 培养组,酶活力从第 4 天后几乎检测不到。此外,随着初始硝酸盐浓度的增加,各培养组硝酸还原酶活力的最大值(NRA<sub>max</sub>)也呈逐渐增大的趋势(虽然 N/P=8 的 NRA<sub>max</sub> 小于空白组,但是前者在接藻后的 1~2 d 均出现较高的值),当 NO<sub>3</sub>N 浓度为 460.8 Lmol/L 时, NRA<sub>max</sub> 达到最大。但随外源硝酸盐浓度的增加,各培养组的 NRA<sub>max</sub> 增大趋势趋于缓慢,不存在显著性差异(P>0.1)。这从一定程度上说明中肋骨条藻的 NR 存在一定阈值:随着硝酸盐浓度的增加, NR 也逐渐增大,当底物浓度接近或超过酶活力阈值所对应的浓度时, NRA 变化趋于缓慢,甚至会出现下降的趋势,这与很多学者在其他海洋浮游植物中得到的结果类似<sup>[17-19]</sup>。

一天均出现了最大值,之后酶活力逐渐降低,并停留在较低水平。此实验条件下,随着初始磷酸盐浓度的增加,各培养组 NRA<sub>max</sub> 逐渐增大,当 N/P=32 时, NRA<sub>max</sub> 达到最大。当初始外源磷酸盐浓度继续增大时, NRA<sub>max</sub> 反而出现下降的趋势。此实验结果进一步表明,中肋骨条藻的 NR 存在一定的阈值,而且此阈值在一定程度上受磷酸盐浓度的影响。

对比图 3 中肋骨条藻在不同硝酸盐浓度以及不

同磷酸盐浓度条件下藻细胞 NRA2培养时间变化图可以发现,在接藻后第 1 天,酶活力迅速增大,其原因可能与底物硝酸盐的诱导有关,空白培养组虽然未添加营养盐,但由于所用海水中有一定的营养盐含量,仍可诱导酶活性的产生。此外,虽然 NRA 整体变化趋势相似,但在 N/P 相同的情况下,后者各培养组的  $NRA_{max}$  要明显高于前者(空白培养组除外),说明该藻的硝酸还原酶活性不仅受 N/P 的影响,还受环境中营养盐绝对浓度的制约。

### 2.3 中肋骨条藻生长与 NRA 的关系

对比不同硝酸盐浓度或不同磷酸盐浓度下中肋骨条藻生长和硝酸还原酶活性(图 1a 和图 3a、图 1b 和图 3b)可以发现,该藻  $NRA_{max}$  均出现在指数生长期(接种后第 1、2 天),早于藻密度最大值的出现时间(第 4、5 天)。后者存在时间滞后的原因可能与该藻对营养盐的代谢过程有关:接种初期,外源硝酸盐被吸收到藻细胞内,诱导 NRA 呈现高值,此时,营养的同化速率加快,藻细胞进入指数增殖时期,藻密度不断增大。但随着外源硝酸盐的消耗,细胞内硝酸盐的累积及亚硝酸盐的形成,酶活性的表达在一定程度上受到抑制,只能维持在较低的水平,营养盐的同化也因此受到限制,藻细胞的分裂逐渐变慢并趋向于零,此时藻密度达到了最大值。此外,实验还发现,培养组的  $NRA_{max}$  越大,平均比生长率就越大,最大藻密度也越大(磷酸盐固定组中 N/P=16 的培养组除外)因此,中肋骨条藻/快起快落0的生长趋势与 NRA 的迅速增大及下降密切相关,此过程有待于从细胞内硝酸盐及亚硝酸盐含量的变化进一步验证。

### 3 结论

在不同氮、磷浓度及结构条件下,对中肋骨条藻的生长及 NRA 随培养时间的变化进行检测,实验结果表明:(1)中肋骨条藻属于营养型藻类,其生长受氮、磷水平及结构的影响,且指数生长期平均比生长率越大,藻密度就越大:当固定  $PO_4^{2-}P$  浓度为  $7.2 \text{ Lmol/L}$  时, N/P=64 的培养组指数生长期平均比生长率最大( $0.67 \text{ d}^{-1}$ ),最大藻密度达到  $8.8 \times 10^5$  个/mL;固定  $NO_3^-N$  浓度为  $176 \text{ Lmol/L}$  时, N/P=16 更适宜该藻的生长,此时指数生长期平均比生长率为  $0.69 \text{ d}^{-1}$ ,最大藻密度约为  $9.8 \times 10^5$  个/mL。(2)同藻的生长一样,中肋骨条藻的硝酸还原酶活力也受氮、磷绝对浓度及结构的影响。(3)中肋骨条藻的硝酸还原酶活力存在一定阈值,此阈值不仅受底物硝酸盐浓度的影响,还受环境中磷酸盐浓度的制

约。(4)藻的生长与营养盐的同化密切相关,且前者存在一定滞后效应,此过程与藻类对营养盐的代谢过程有关。

#### 参考文献:

- [1] Beevers L, Hageman R H. Nitrate and nitrite reduction [J]. *The Biochemistry of Plants*, 1980, 5: 1152168.
- [2] Solomonson I P, Barber M J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1990, 41: 225253.
- [3] 李果龙, 焦瑞身. 地中海拟无枝菌 U232 对硝酸盐的同化及其硝酸还原酶特性 [J]. *微生物学报*, 1995, 35 (2): 142148.
- [4] 唐洪杰, 王金花, 祝陈坚, 等. 几种海洋微藻硝酸还原酶特性的初步研究 [J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(6): 48254.
- [5] 李铁, 史致丽, 李俊. 营养盐对中肋骨条藻和新月菱形藻部分生化组成和性质的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 2000, 31(3): 232245.
- [6] 李铁, 史致丽, 仇赤斌. 中肋骨条藻和新月菱形藻对营养盐的吸收速率及环境因素影响的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(6): 6402645.
- [7] 李铁, 胡立阁, 史致丽. 营养盐对中肋骨条藻和新月菱形藻生长和氮磷组成的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 2000, 31(1): 46252.
- [8] 杨登峰, 赵卫红, 李金涛, 等. 磷酸盐对中肋骨条藻生长的影响 [A]. *中国科学院海洋研究所. 海洋科学集刊* (46) [C]. 北京: 科学出版社, 2004. 162171.
- [9] 李金涛, 赵卫红, 杨登峰, 等. 室内培养研究硝酸盐对中肋骨条藻生长的影响 [A]. *中国科学院海洋研究所. 海洋科学集刊* (46) [C]. 北京: 科学出版社, 2004. 152164.
- [10] 候继灵, 张传松, 石晓勇, 等. 磷酸盐对两种东海典型赤潮藻影响的围隔实验 [J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(增刊): 162169.
- [11] 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: 162186.
- [12] Serra J L, Llama M J, Cadenas E. Nitrate utilization by the diatom *Skeletonema costatum* [J]. *Plant Physiology*, 1978, 62: 992994.
- [13] Berges J A, Harrison P J. 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*, 1995, 40(1): 8293.
- [14] John E H, Flynn K J. Growth dynamics and toxicity

- of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): The effect of changing N: P supply ratios on internal toxin and nutrient levels [J]. *Eur J Phycol*, 2000, 35: 1223.
- [15] 张冬鹏, 武宝开. 几种赤潮藻对温度、氮、磷的响应及藻间相互作用的研究 [J]. *暨南大学学报: 自然科学版*, 2000, 21(5): 82287.
- [16] 吕颂辉, 李英. 我国东海4种赤潮藻的细胞氮磷营养储存能力对比 [J]. *过程工程学报*, 2006, 6(3): 432444.
- [17] Berges J A, Cochlan W P, Harrison PJ. Laboratory and field responses of algal nitrate reductase to diel periodicity in irradiance, nitrate exhaustion, and the presence of ammonium [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1995, 124: 252269.
- [18] 吕嘉扬, 王大志, 洪华生, 等. 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 [J]. *集美大学学报*, 2004, 9(1): 210.
- [19] 王艳, 唐海溶, 蒋磊, 等. 硝酸盐对球形棕囊藻生长和硝酸还原酶活性的影响 [J]. *植物学通报*, 2006, 23(2): 132144.
- [20] Wada E, Hattori A. Nitrogen in the sea: Forms, Abundances, and Rate Process [M]. Boca Raton: CRC Press, 1991. 208.

## The effects of nitrate and phosphate on the growth and nitrate reductase activity of *Skeletonema costatum*

WANG Jinhua, TANG Hongjie, YANG Rujun, WANG Xulin

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Marine Polluted Geochemistry Lab, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

Received: Nov. , 20, 2007

Key words: Nitrate; Phosphate; *Skeletonema costatum*; nitrate reductase; nitrate reductase activity; specific growth rate

**Abstract:** The growth and nitrate reductase activity (NRA) of *Skeletonema costatum* were studied under different concentrations and structures of nitrate and phosphate in laboratory cultures. The results indicated that *S. costatum* is a nutrient-dependent species and the algae multiplied exponentially after adding nitrate or phosphate into the culture. The cell density in each group not only reached its maximum value in the fourth to fifth day after inoculation, but also showed a significant difference ( $P < 0.01$ ) to the control group. The results also revealed that the growth and NRA of *S. costatum* were affected by both concentrations and ratio of nutrients. Furthermore, the appearing time of  $NRA_{max}$  (1~2 d) was during the period of exponential growth which was earlier than that of the maximum cell density (4~5 d). It was suggested that the growth of *S. costatum* had a lagging effect, which was not consistent with the assimilation of the nutrients. In addition, the NRA of *S. costatum* has a certain threshold.

(本文编辑: 张培新)