

# 基于<sup>15</sup>N 稳定同位素技术的斜生栅藻对硝氮和氨氮吸收研究

包苑榆<sup>1</sup>, 钟 萍<sup>1</sup>, 韦桂峰<sup>1</sup>, 郭海森<sup>1</sup>, 刘正文<sup>1,2</sup>

(1. 暨南大学水生生物研究中心, 广东 广州 510632; 2. 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 江苏 南京 210008)

**摘要:** 硝氮( $\text{NO}_3^-$ -N)和氨氮( $\text{NH}_4^+$ -N)是水体中无机氮的主要形态。利用<sup>15</sup>N 稳定同位素技术研究了斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)对 $\text{NO}_3^-$ -N和 $\text{NH}_4^+$ -N的吸收特征。结果显示,在相同浓度条件下,斜生栅藻对 $\text{NH}_4^+$ -N的吸收速率显著高于对 $\text{NO}_3^-$ -N的吸收率,在180 min的试验中,对<sup>15</sup> $\text{NH}_4^+$ -N的吸收速率为 $0.62 \sim 1.15 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ;对<sup>15</sup> $\text{NO}_3^-$ -N的吸收速率为 $0.08 \sim 0.15 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。在 $\text{NO}_3^-$ -N和 $\text{NH}_4^+$ -N 2种形态氮源同时存在的混合组中,斜生栅藻对 $\text{NO}_3^-$ -N的吸收速率 $[0.12 \sim 1.00 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})]$ 显著低于 $\text{NO}_3^-$ -N作为唯一氮源的单一组 $[0.78 \sim 1.23 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})]$ ,表明 $\text{NH}_4^+$ -N的存在对藻类吸收 $\text{NO}_3^-$ -N有抑制作用。在<sup>14</sup> $\text{NO}_3^-$ -N和<sup>15</sup> $\text{NO}_3^-$ -N同时存在时,斜生栅藻优先吸收<sup>14</sup> $\text{NO}_3^-$ -N,产生同位素分馏效应,但不同形态氮对藻类氮吸收的影响远远大于同位素的影响。

**关键词:** <sup>15</sup>N 稳定同位素;斜生栅藻;硝氮;氨氮

**中图分类号:** Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2011)03-0016-05

人类的频繁活动加剧了水体富营养化,导致浮游植物的大量繁殖,容易暴发“水华”。氮是影响浮游植物生产力的主要因素之一,而硝氮和氨氮是藻类利用氮的主要形态(Chapman & Craigie, 1977; Dortch, 1982)。研究藻类对氮吸收的传统方法主要是通过测定不同时间溶液中氮含量的变化来计算(Harlin & Wheeler, 1985);但有研究发现,培养过程中藻类除了消耗溶液中的氮外,也会向溶液中释放氮(Dugdale & Goering, 1967),所以该方法并不能很好地反映藻类对氮的吸收情况。随着稳定同位素示踪技术的飞速发展,越来越多的学者开始利用<sup>15</sup>N 稳定同位素研究藻类对氮的吸收(Haxen & Lewos, 1981; Peterson & Fry, 1987; Waser et al, 1998)。<sup>15</sup>N 稳定同位素技术具有灵敏度高、藻类吸收试验时间短、氮吸收的关键过程更清楚等优点(Fujita et al, 1988)。单一形态氮吸收动力学的研究已有很多,这些研究通常反映藻类在饥饿状态下对某种单一形态氮的吸收情况。自然水体通常同时存在多种形态的氮,而利用<sup>15</sup>N 稳定同位素技术比较在多种形态氮源共存的富营养条件下,藻类对不同形态氮吸收特征的研究尚未见报道。

有研究表明,水体中氮缺乏时铜绿微囊藻易形成优势,氮丰富时斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)容易形成优势(许海等,2008),说明氮对斜生栅藻竞争力有重要的影响;然而,藻类对不同形态氮的吸收速率不同,说明氮对藻类的影响可能与氮的形态有关。本文以斜生栅藻为对象,通过设置单一形态氮(硝氮)和混合形态氮(硝氮+氨氮)2组试验,利用<sup>15</sup>N和<sup>14</sup>N区分不同形态氮源,测定斜生栅藻<sup>15</sup>N的含量,从而计算出藻类对氮的吸收速率,探讨不同形态氮源对藻类吸收的影响,从而揭示氮源形态对浮游植物群落结构的影响机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种分离与培养

斜生栅藻分离自暨南大学明湖,纯化后保种于暨南大学水生生物研究所藻种室,于试验前进行扩大培养。

### 1.2 试验设计

取一定量的藻液,以3 200 r/min的速度离心5 min,去掉上清液后用无氮培养基洗涤,再次离心去上清液,如此重复2次,接种于装有培养液的三角瓶中。试验所用的培养基是在BG11配方(Rippka & Herdman, 1992)的基础上改良,将总氮(TN)浓度调整为3.0 mg/L并改变其氮源。试验设置单一形态氮( $\text{NO}_3^-$ -N)和混合形态氮( $\text{NO}_3^-$ -N +  $\text{NH}_4^+$ -N)2组,见表1。<sup>15</sup> $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ 的<sup>15</sup>N丰度均达99.0%以上。

收稿日期:2011-01-20

基金项目:国家自然科学基金(U0733007、U1033602和41073057)资助。

通讯作者:刘正文。E-mail: zliu@niglas.ac.cn

作者简介:包苑榆,1985年,女,硕士研究生,主要从事淡水生态与环境修复研究。E-mail: xuanyecao\_85@163.com

表1 试验组设置及氮源浓度

Tab. 1 Concentration and forms of nitrogen source used in groups mg/L

氮源	单一组	混合组
<sup>14</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	2.5	2.5
<sup>15</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0.5	0.0
<sup>15</sup> NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	0.0	0.5
TN	3.0	3.0

斜生栅藻生物量用干重表示,用已称重的 GF/F 滤膜定量抽滤藻液,然后将滤膜置于烘箱中 60℃ 烘 48 h 至恒重,减去滤膜重量即为藻的生物量。

试验在添加氮后分别于 0、30、60、90、120、150、180 min 取样,立即以 5 000 r/min 离心,将上清液置于小瓶中,于 4℃ 下保存并用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定溶解态总氮 (DTN) 的浓度。剩下的藻泥置于烘箱中 60℃ 烘 48 h 至恒重,放入锡囊,用英国 Sercon 20-20 质谱仪对斜生栅藻中的 <sup>15</sup>N 稳定同位素测定 δ<sup>15</sup>N (δ<sup>15</sup>N 为 <sup>15</sup>N 稳定同位素比率,指样品中 <sup>15</sup>N 稳定同位素比值相对标准相应比值的千分偏差)。

### 1.3 计算公式

#### 1.3.1 斜生栅藻 <sup>15</sup>N 吸收速率

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = (R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}} - 1) \times 1\,000 \quad (1)$$

式中  $R_{\text{样品}}$ 、 $R_{\text{标准}}$  分别为样品和标准的 <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N, 氮稳定性同位素分析标准为空气 (Moriotti, 1984)。

$$\text{由(1)式得到: } R_{\text{样品}} = [\delta^{15}\text{N}(\text{‰})/1\,000 + 1] \times R_{\text{标准}} \quad (2)$$

<sup>15</sup>N 同位素占藻内 N 的原子比例 ( $A, \%$ ) 用下式得出:

$$A = R_{\text{样品}}/(R_{\text{样品}} + 1) \quad (3)$$

<sup>15</sup>N 同位素富集度  $a_1(\%)$  由下式得出:

$$a_1 = A - a_0 \quad (4)$$

式(4)中:  $a_0$  为试验添加前藻 <sup>15</sup>N 丰度,  $a_0 = 0.365\%$ 。

藻对 <sup>15</sup>N 的吸收速率  $V_1 [\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})]$  计算式:

$$V_1 = b \times a_1 \times 100 / (15 \cdot T) \quad (5)$$

式中:  $b$  为样品中 N 占干重的比例 ( $\%$ ); 15 为 <sup>15</sup>N 的原子量;  $T$  为反应吸收的时间 (min)。

#### 1.3.2 斜生栅藻 <sup>14</sup>N 吸收速率

$$V_2 = (C_f - C_i) / (D_w \cdot T) \quad (6)$$

式中:  $V_2$  为斜生栅藻对 <sup>14</sup>N 的吸收速率 [ $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ];  $C_i$ 、 $C_f$  分别为某段时间内溶液中 DTN 的起始浓度和结束浓度 ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ );  $D_w$  为斜生

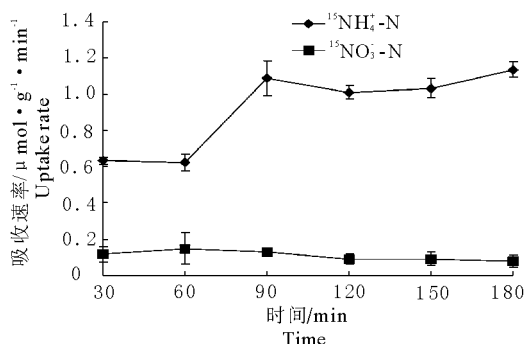
栅藻的生物量 ( $\text{g}/\text{L}$ );  $T$  为反应吸收的时间 (min)。

## 2 结果

### 2.1 斜生栅藻对 <sup>15</sup>N 的吸收速率

单一组和混合组中 <sup>15</sup>N 的浓度均为 0.5 mg/L, 斜生栅藻对 <sup>15</sup>N 的吸收速率分别代表了对 <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的吸收速率, 结果见图 1。可见斜生栅藻对 <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的吸收速率始终远大于对 <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 吸收速率。

斜生栅藻对 <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的吸收速率随时间的增加呈上升趋势, 且幅度较大, 从 30 min 时的 0.63  $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$  升至 180 min 时的 1.13  $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ; 对 <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的吸收速率随时间的增加呈下降趋势, 但幅度较小, 从 30 min 时的 0.12  $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$  降至 180 min 时的 0.08  $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ 。

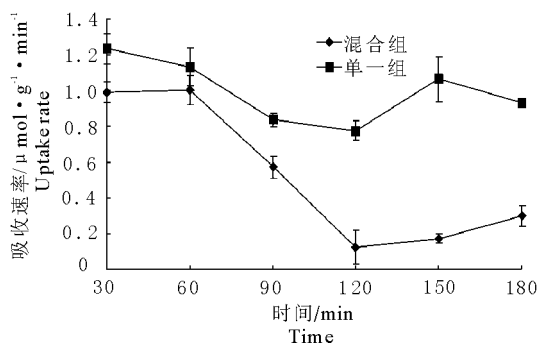
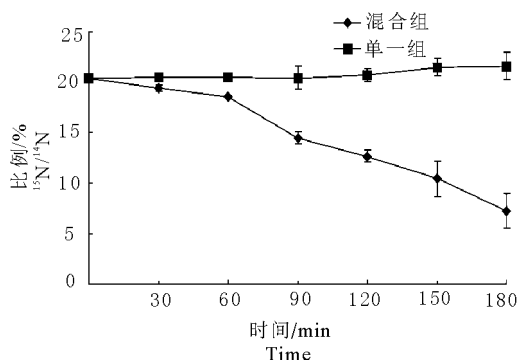
图1 斜生栅藻对<sup>15</sup>N 的吸收速率Fig. 1 Comparison of <sup>15</sup>N uptake rate in single and mixed groups

### 2.2 斜生栅藻对 <sup>14</sup>N 的吸收速率

单一组和混合组中的 <sup>14</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 初始浓度均为 2.5 mg/L, 斜生栅藻对 <sup>14</sup>N 的吸收速率见图 2。结果显示, 单一组始终高于混合组。随着吸收时间增加, 单一组和混合组中斜生栅藻对 <sup>14</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的吸收速率均有所下降, 混合组下降的幅度比单一组大。

### 2.3 <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N 比较

单一组和混合组中 <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N 的初始比例均为 20.35%。随着斜生栅藻对氮的选择性吸收, 培养液中的 <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N 比例不断变化, 且在单一组和混合组表现出不一样的趋势, 见图 3。在单一组中, 溶液中 <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N 的比例随着时间的增加而上升, 但是 180 min 内上升的幅度非常小, 从开始的 20.35% 升至 180 min 时的 21.57%; 混合组中的 <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N 的比例随着时间的增加而下降, 并且下降幅度较大, 从开始时的 20.35% 下降至 180 min 时的 7.21%。

图2 斜生栅藻对 $^{14}\text{N}$ 的吸收速率Fig. 2 Comparison of  $^{14}\text{N}$  uptake rate in single and mixed groups图3 藻对 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 的吸收速率比较Fig. 3 Comparison of  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  in the medium solution of single and mixed groups

### 3 讨论

#### 3.1 斜生栅藻对氨氮和硝氮的吸收速率

斜生栅藻对 $^{15}\text{NH}_4^+$ -N的吸收率显著高于 $^{15}\text{NO}_3^-$ -N,说明斜生栅藻偏好吸收 $\text{NH}_4^+$ -N。Morris (1974)、Ohmori等(1977)和Guerrero等(1981)也发现,蓝藻和多种其他微藻对 $\text{NH}_4^+$ -N的吸收利用优于其他形态的氮源,这是因为藻类可以直接以 $\text{NH}_4^+$ -N作为合成氨基酸的底物,而 $\text{NO}_3^-$ -N要通过一系列酶先还原成 $\text{NO}_2^-$ -N再还原成 $\text{NH}_4^+$ -N方能被藻类用以合成氨基酸。

斜生栅藻对 $^{15}\text{NH}_4^+$ -N的吸收速率在60 min前较为平缓,之后显著上升,可能是由于溶液中氨氮初始浓度较高,且不在藻类吸收的理想浓度范围内,故对藻类吸收氨氮产生一定的抑制作用。Arzul等(2001)对米氏凯伦藻的研究结果指出,当氨氮浓度达到30.0~46.5  $\mu\text{mol/L}$ 时,抑制藻的同化作用。本试验进行到60 min时, $^{15}\text{NH}_4^+$ -N浓度下降到29.28  $\mu\text{mol/L}$ ,斜生栅藻吸收氨氮受到的抑制作用减小,故60 min后对 $^{15}\text{NH}_4^+$ -N吸收速率逐渐上升。由此可见,湖泊等水体氨氮的增加对藻类生长影响

比硝氮更显著,对浮游植物群落结构的影响也更大。

混合组中斜生栅藻对 $^{14}\text{NO}_3^-$ -N的吸收速率始终低于单一组(图2),可能是因为 $^{15}\text{NH}_4^+$ -N的存在,抑制了斜生栅藻对 $\text{NO}_3^-$ -N的吸收,这与已有研究中得到的 $\text{NH}_4^+$ -N抑制藻类吸收 $\text{NO}_3^-$ -N的结论一致(Ohmori et al, 1977; Dortch, 1990; Lomas & Glibert, 1999)。混合组中 $^{14}\text{NO}_3^-$ -N吸收速率于60 min后显著降低,主要是由于0~60 min时溶液中 $^{15}\text{NH}_4^+$ -N浓度较高,抑制了斜生栅藻对氨氮的同化作用,此段时间内藻对硝氮的吸收受到氨氮影响相对较小,故 $^{14}\text{NO}_3^-$ -N的吸收速率较大。而后 $^{15}\text{NH}_4^+$ -N浓度下降到一定程度,斜生栅藻对 $^{15}\text{NH}_4^+$ -N的吸收速率开始上升,从而抑制了对 $^{14}\text{NO}_3^-$ -N的吸收,所以60 min后, $^{14}\text{NO}_3^-$ -N吸收速率下降。目前在研究藻类对氮的吸收时,往往用不同形态氮分别对藻类进行培养,然后比较吸收特征,根据吸收速率等特征的大小,分析不同形态氮对藻类的影响(Harlin & Wheeler, 1985)。而在水体中,往往是不同形态的氮同时存在,互相可能存在干扰。本研究利用 $^{15}\text{N}$ 稳定同位素技术,设置混合形态氮源对斜生栅藻进行培养,得到藻对不同形态氮吸收特征,结果显示同一种形态氮在混合组中的吸收速率不同于单一组,更直接和真实地证明多种形态氮同时存在时,藻类对一种形态氮的吸收受另一种形态氮的影响。

#### 3.2 同位素对斜生栅藻吸收氨氮和硝氮的影响

由于不同同位素之间存在原子质量差异,反应速率也有差异(黄达峰等,2006)。在单一组中同时存在 $^{14}\text{NO}_3^-$ -N和 $^{15}\text{NO}_3^-$ -N,因此斜生栅藻优先吸收 $^{14}\text{NO}_3^-$ -N,这种同位素分馏可能会低估斜生栅藻对 $^{15}\text{NO}_3^-$ -N的吸收。溶液中剩下的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 在试验过程中变化不大,因此这种分馏作用影响较小,故对 $^{15}\text{NO}_3^-$ -N吸收的低估不多。

单一组中,添加的 $^{15}\text{N}$ 和 $^{14}\text{N}$ 均为硝氮,溶液中 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 的比例随着时间的增加而上升,主要是由于斜生栅藻优先吸收 $^{14}\text{N}$ ,造成同位素分馏效应,使溶液中剩余的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 的比例逐渐上升,但在180 min内,溶液中 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 增长很小,即同位素分馏不大。而混合组中的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 的比例随着时间而下降(图3),且下降幅度较大,这是由于 $^{15}\text{N}$ 为氨氮,而 $^{14}\text{N}$ 为硝氮,氮形态的不同造成藻类对 $^{15}\text{N}$ 和 $^{14}\text{N}$ 吸收的巨大差异,剩下培养液中 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 大幅下降。该结果也表明,不同形态氮对藻类氮吸收的影响远远大于同位素分馏的影响。

## 参考文献

- 黄达峰, 罗修泉, 李喜斌, 等. 2006. 同位素质谱技术与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社.
- 许海, 杨林章, 刘兆普. 2008. 铜绿微囊藻和斜生栅藻生长的氮营养动力学特征 [J]. 环境科学研究, 21(1): 69-73.
- Arzul G, Seguel M, Clement A. 2001. Effect of marine animal excretions on differential growth of phytoplankton [J]. ICES Journal of Marine Science, 58: 386-390.
- Chapman A R O, Craigie J S. 1977. Seasonal growth in *Laminaria longicruris*: relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen [J]. Marine Biology, 40: 197-205.
- Dortch Q. 1982. Effect of growth conditions on accumulation of internal nitrate, ammonium, amino acids, and protein in three marine diatoms [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 61(3): 243-264.
- Dortch Q. 1990. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton [J]. Marine Ecology Progress Series, 61: 183-201.
- Dugdale R C, Goering J J. 1967. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity [J]. Limnology and Oceanography, 12(2): 196-206.
- Fujita R M, Wheeler P A, Edwards R L. 1988. Metabolic regulation of ammonium uptake by *Ulva rigida* (Chlorophyta): a compartmental analysis of the rate-limiting step for uptake [J]. Journal of Phycology, 24: 560-566.
- Guerrero M G, Vega J M, Losads M. 1981. The assimilatory nitrate reducing system and its regulation [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 32: 169-204.
- Harlin M M, Wheeler P A. 1985. Ecological Field Methods: Macroalgae. Handbook of Phy-cological Methods [M]. Cambridge, New York: Cambridge University Press: 493-508.
- Haxen P G, Lewos A M. 1981. Nitrate assimilation in the marine kelp, *Macrocystis angustifolia* (Phaeophyceae) [J]. Botany Marne, 24: 631-635.
- Lomas M W, Glibert P M. 1999. Interactions between  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  uptake and assimilation: comparison of diatoms and dinoflagellates at several growth temperatures [J]. Marine Biology, 133: 541-551.
- Mariotti A. 1984. Natural  $^{15}\text{N}$  abundance measurements and atmospheric nitrogen standard calibration [J]. Nature, 311: 251-252.
- Morris I. 1974. Nitrogen assimilation and protein synthesis: Algal physiology and biochemistry [C]. Oxford, Blackwell Scientific Publishers: 583-609.
- Naldi M, Wheeler P A. 2002.  $^{15}\text{N}$  measurements of ammonium and nitrate uptake by *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta): comparison of net nutrient disappearance, release of ammonium and nitrate, and  $^{15}\text{N}$  accumulation in algal tissue [J]. Journal of Phycology, 38: 135-155.
- Ohmori M, Ohmori K, Strotmann H. 1977. Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga, *Anabaena cylindrica* [J]. Archives of Microbiology, 114: 225-229.
- Peterson B J, Fry B. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies [J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 18: 293-320.
- Waser N A D, Harrison P J, Nielsen B et al. 1998. Nitrogen isotope fractionation during the uptake and assimilation of nitrate, nitrite, ammonium, and urea by a marine diatom [J]. Limnology and Oceanography, 43(2): 215-224.

(责任编辑 万月华)

## Study on Uptake of Nitrate and Ammonium by *Scenedesmus obliquus* Based on $^{15}\text{N}$ Stable Isotope Technique

BAO Yuan-yu<sup>1</sup>, ZHONG Ping<sup>1</sup>, WEI Gui-feng<sup>1</sup>, GUO Hai-sen<sup>1</sup>, LIU Zheng-wen<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ -N) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ -N) nitrogen are the main forms of inorganic nitrogen in waters. This paper studied the uptake characteristics of  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{NH}_4^+$ -N by *Scenedesmus obliquus* based on  $^{15}\text{N}$  stable isotope technique. The result showed that the  $\text{NH}_4^+$ -N uptake rate was significantly higher than  $\text{NO}_3^-$ -N uptake rate at the same nitrogen concentration,  $^{15}\text{NH}_4^+$ -N uptake rate was  $0.62 - 1.15 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$  while  $^{15}\text{NO}_3^-$ -N uptake rate was  $0.08 - 0.15 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$  in this 3 h experiment. The  $\text{NO}_3^-$ -N uptake rate in the mixed nitrogen group [ $0.12 - 1.00 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ] in which both  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{NH}_4^+$ -N presented was significantly lower than that in the single nitrogen group [ $0.78 - 1.23 \mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min})$ ] in which only  $\text{NO}_3^-$ -N presented, indicating that the presence of  $\text{NH}_4^+$ -N inhibits the uptake of  $\text{NO}_3^-$ -N. The result also showed that when  $^{15}\text{NO}_3^-$ -N and  $^{14}\text{NO}_3^-$ -N existed simultaneously, *Scenedesmus obliquus* took up  $^{14}\text{NO}_3^-$ -N preferentially which produces isotope fractionation. However, the effect of different forms of nitrogen source is far greater than the effect of isotope fractionation.

**Key words:**  $^{15}\text{N}$  stable isotope; *Scenedesmus obliquus*; nitrate; ammonium