

黑暗条件下不同氮源对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 生长和 pH 的影响

孔 倩¹, 杨柳燕^{1,*}, 肖 琳¹, 袁丽娜¹, 张丹宁², 张哲海²

(1. 污染控制与资源化研究国家重点实验室/南京大学环境学院, 南京 210093; 2. 南京市环境监测中心站 南京 210013)

摘要:在黑暗条件下,利用不同形态的氮源(硝酸盐氮,氨氮,有机氮和硝酸盐氮,有机氮)培养蓝藻水华优势种铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*),分析其氮代谢和对水体 pH 的影响。研究表明,在不同氮源的培养液中铜绿微囊藻密度在最初的 24 h 内出现波动,之后下降。培养液中 pH 值在试验最初的 24 h 显著下降,之后趋于稳定,在硝态氮培养液中 pH 值下降最大,从 8.18 下降到 7.19,其反硝化作用产生的 NO_2^- 浓度也最大。不同氮源培养液中总氮含量都有所下降,以混合氮源培养液中总氮减少量最大,说明化合态氮经过反硝化作用生成了氮气并溢出培养液,因此,在黑夜条件下藻华水体中存在反硝化作用。

关键词:铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*); pH 值; 氮形态; 反硝化作用

文章编号:1000-0933(2008)05-2060-05 中图分类号:Q142, Q178, Q938, Q949.2 文献标识码:A

Effect of different nitrogen forms on the growth of *Microcystis aeruginosa* and pH in the medium under darkness

KONG Qian¹, YANG Liu-Yan¹, XIAO Lin¹, YUAN Li-Na¹, ZHANG Dan-Ning², ZHANG Zhe-Hai²

1 State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China

2 Nanjing Environmental Measure Center, Nanjing 210013, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(5): 2060 ~ 2064.

Abstract: To investigate the nitrogen metabolism by *M. aeruginosa* and pH changes in the mediums under darkness, we cultured *Microcystis aeruginosa*, a dominant species in algal bloom, with different nitrogen forms including NO_3^- , NH_4^+ , Bicine (N, N-Bis(2-hydroxyethyl) glycine) and Bicine + NO_3^- . Our results show that the densities of *M. aeruginosa* fluctuate within first 24 h of culture, and decrease after 24 h. However, the pH values in the mediums decrease significantly within the first 24 h in all experimental treatments and then gradually stabilize to a fixed value. The biggest decrease of pH value appears in the NO_3^- medium, changing from 8.18 to 7.19. Interestingly, the biggest increase of NO_2^- concentration appears in the same medium. The total amount of nitrogen decreases in all experimental mediums, specially in the medium containing Bicine and NO_3^- , and the decreased nitrogen is transformed to N_2 through denitrification, then escaping from water into air. The results suggest that denitrification of *M. aeruginosa* happens when nitrate is supplied under darkness.

基金项目:国家“973”资助项目(2002CB412307);国家自然科学基金资助项目(40371102);南京市环境保护局资助项目

收稿日期:2007-02-28; **修订日期:**2007-10-22

作者简介:孔倩(1983~),女,河北南宫人,硕士生,主要从事环境微生物研究. E-mail: renqing1127@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yangly@nju.edu.cn

Foundation item: This work was financially supported by the Ministry of Science and Technology of China (No. 2002CB412307), National Natural Science Foundation of China (No. 40371102) and Nanjing Environmental Protection Bureau, China

Received date: 2007-02-28; **Accepted date:** 2007-10-22

Biography: KONG Qian, Master candidate, mainly engaged in environmental microbiology. E-mail: renqing1127@163.com

Key Words: *Microcystis aeruginosa*; pH value; nitrogenous compound; denitrification

在富营养化湖泊中,铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)常常是蓝藻水华的优势种,铜绿微囊藻的生长会使水体的 pH 值超过 9^[1~3],其原因是铜绿微囊藻通过光合作用吸收 CO₂使水体 pH 升高^[4,5],另外的研究表明高 pH 值更有利于它的生长^[6,7],因此,铜绿微囊藻的生长与水体 pH 的关系是一种交互作用的过程,研究它们之间的关系显得很有必要。

氮是植物的主要组成成分,对植物光合速率、暗反应的主要酶以及光呼吸等都有明显的影响,直接或间接影响着光合作用^[8]。氮源在蓝藻水华暴发过程中起着很重要的作用,蓝藻可以吸收不同形态的氮,其同化过程受 pH 值的影响^[9,10],同时不同形态氮的代谢途径是不同的,这个过程又会影响到水体 pH 值。因此,分析铜绿微囊藻生长与氮代谢和 pH 值关系对于探索富营养化湖泊蓝藻水华暴发的机理具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)由中国科学院武汉水生生物研究所提供,编号为 Fachb469,用改良的 MA 培养基培养。培养条件为温度 25 ℃、光暗比 12h/12h 和光照度 27.5 μmol·m⁻²·s⁻¹。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基配方

MA 培养基中氮源分别为硝酸盐、铵盐、Bicine(N, N-双(2-羟乙基)甘氨酸)和混合氮源(硝酸盐和 Bicine),分别用 NO₃⁻-N, NH₄⁺-N, Org-N 和 NO₃⁻-N + Org-N 表示。

1.2.2 接种及培养

将处于对数生长期铜绿微囊藻经离心(7000 r·min⁻¹, 15 min)和洗涤后接入试验培养液中,初始藻密度约 8 × 10⁶ cell·ml⁻¹(相当于蓝藻暴发时较高藻密度),黑暗条件下 25 ℃培养。

1.2.3 测定指标及方法

(1)用 HI8424 精密 pH 计测定培养液 pH 值。

(2)铜绿微囊藻生长曲线的测定:测铜绿微囊藻培养液的光密度 OD_{460nm}和用血小球计数板计数铜绿微囊藻的浓度,作相关性曲线得到光密度(x)与细胞数量(y)的方程为 $y = 852.8x - 10.56$ ($r = 0.997$),因此,测定微囊藻培养液的光密度,再根据该公式换算得到藻细胞数,通过藻细胞与其干重的换算系数 1.32×10^{-7} mg^[11],求得干重。

(3)分别在试验开始和结束时,直接用碱性过硫酸钾消解含藻培养液,采用过硫酸钾氧化紫外分光光度法测定 1 ml 藻液体系中总氮含量。

(4)取藻液 4 ml, 7000 r·min⁻¹离心 15 min,采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定上清液中 NO₂⁻的含量。

2 结果及讨论

2.1 黑暗条件下不同氮源对铜绿微囊藻生长的影响

黑暗条件下,不同氮源对铜绿微囊藻密度的影响见图 1。由图 1 可知不论何种氮源铜绿微囊藻密度都呈下降的趋势。以 NO₃⁻-N + Org-N 为氮源时藻密度下降趋势最明显,从开始的 8.03×10^6 cell·ml⁻¹下降到最低值为 5.81×10^6 cell·ml⁻¹。其它 3 个不同氮源存在时,铜绿微囊藻密度下降趋势接近,下降速率较 NO₃⁻-N + Org-N 为氮源时迟缓。说明高浓度的硝态氮不利于微囊藻的生长,这个与在蓝藻水华暴发水体中硝态氮含量较低相一致。微囊藻是一类光合自养原核生物,属蓝细菌,但其中一些可以吸收简单的溶解性有机碳进行异养生长^[12, 13]。Kirkwood^[14]等从纸浆和造纸废水中分离出 21 种蓝细菌,其中 19 种可以在黑暗中吸收利用葡萄糖。已有研究表明,丝状固氮蓝藻 *Nostoc punctiforme*^[15],单细胞蓝藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803^[16],念球藻(*Nostoc* sp.)^[17]等均可以进行异养生长。念球藻属在异养生长条件下,有机碳利用率和 N₂ 同化率保持在很高水平,并且保持了很好的生物合成活性和快速转化到光合代谢的能力^[17]。本试验中,藻密度在试验前 24 h

出现了波动,即使在有机氮存在时,铜绿微囊藻的异养生长能力也不明显。

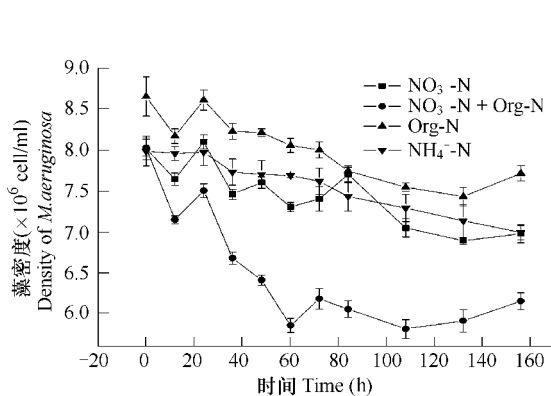


图1 黑暗条件下不同氮源对铜绿微囊藻生长的影响

Fig. 1 Effect of different nitrogenous compounds on the growth of *M. aeruginosa* under darkness

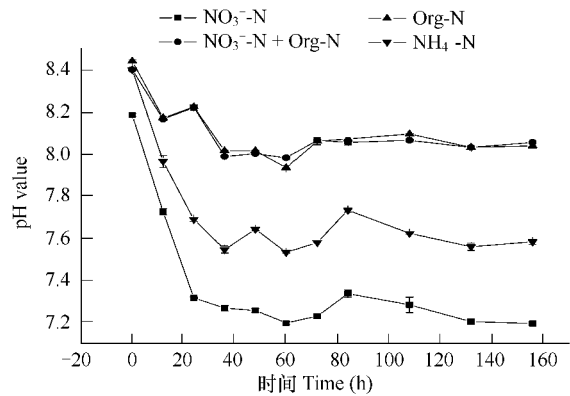


图2 黑暗条件下不同氮源对培养液 pH 值的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogenous compounds on the variation of pH in the medium of *M. aeruginosa* under darkness

2.2 黑暗条件下不同氮源对培养液 pH 值的影响

黑暗条件下,不同氮源对培养液中 pH 值影响见图 2。由图 2 可知,在试验最初 24 h 培养液的 pH 下降速率最快,之后基本保持稳定。 NO_3^- -N 培养体系中 pH 值下降最大,从最初的 8.18 下降到 7.19, NO_3^- -N + Org-N 和 Org-N 的培养体系中 pH 值变化趋势相同,从 8.40 分别下降到 8.06 和 8.04。这是由于该试验中所用有机氮为 Bicine, Bicine 为生物化学和医学研究的 pH 缓冲剂^[18]。Bicine 同时具有氨基酸和氨基乙醇的性质,具有一个被取代的氨基,一个羧基和两个羟基作为配位基团,可以以单电荷阴离子形式与金属离子形成配合物, Bicine 与金属离子可以形成稳定的二元配合物,而且缓冲物质还可以与金属离子生成三元配合物,因此,在有机氮存在时培养液中 pH 下降程度较硝态氮和铵态氮小。

2.3 黑暗条件下,不同氮源对培养液中 NO_2^- 浓度的影响

在试验过程中,培养液中 NO_2^- 含量变化过程见图 3,黑暗培养 48 h 后氮源为 NO_3^- -N 和 NO_3^- -N + Org-N 的两个处理组培养液中 NO_2^- 含量随着时间呈明显增加趋势,108 h 达到最大值,分别为 0.253 和 0.205 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。氮源为 NO_3^- -N 的培养液中 NO_2^- 浓度较氮源为 NO_3^- -N + Org-N 的高,同时浓度上升的增长速率快。氮源为 Org-N 和 NH_4^+ -N 时, NO_2^- 浓度很低,接近于 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此,在硝态氮的培养液中,黑暗条件下铜绿微囊藻具有反硝化作用。

2.4 黑暗条件下不同氮源对试验前后培养液中总氮含量的影响

为了了解黑暗条件下铜绿微囊藻反硝化作用的能力,对试验前后培养液中总氮浓度进行分析(图 4)。从图 4 可见,不同氮源时培养液中总氮含量都有不同程度的下降,氮源为 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N 和 NO_3^- -N + Org-N 培养液中总氮分别从 46.91 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、40.28 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 109.44 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降到 45.65 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、34.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 85.12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以混合氮为氮源时总氮减少量最大,占初始值的 22.2%,氮源为 NH_4^+ -N 时总氮减少量最小,占初始量的 2.69%。经 *t* 检验分析,各试验组具有显著性差异,氮源为 NH_4^+ -N 与 NO_3^- -N, NH_4^+ -N 与 NO_3^- -N + Org-N, NO_3^- -N 与 NO_3^- -N + Org-N 之间 *t* 检验得到的 *p* 值分别为 $p = 0.017$, $p = 0.0120$, $p = 0.030$, $p < 0.05$ 。这表明各试验体系中发生了不同程度的反硝化作用,使含氮化合物转化为氮气,并释放到大气中。

黑暗条件下,铜绿微囊藻进行呼吸作用,产生 CO_2 ,使水体 pH 值降低。该试验中氮源为氨氮与硝态氮时铜绿微囊藻的衰亡曲线趋势相同,但其 pH 值降低程度却不同,这可能是由于硝态氮发生了反硝化作用。已有研究表明,普通反硝化细菌进行反硝化的生化过程如下式所示: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 12\text{NO}_3^- \rightarrow 6\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 + 12\text{NO}_2^-$ + 能量,该过程中产生 CO_2 , CO_2 溶于水后使水体中 pH 值降低。培养液中总氮含量的降低可能是由于反硝化

作用 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$, 该过程会产生消耗 H^+ , 还需要有机物中的氢, $2\text{H}^+ + 5\text{H}_2 + 2\text{NO}_3^- = \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}^{[19]}$, 这个过程在有有机物存在的条件下进行的更强烈, 因此, 铜绿微囊藻利用有机氮作为有机物进行反硝化作用, 这是为什么氮源为混合氮的培养液中总氮含量下降最强烈的原因。培养液中 pH 值的变化受以上两个过程的共同作用, 其结果有待进一步试验验证。

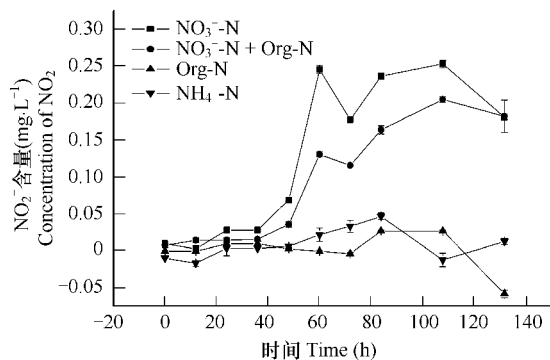


图3 黑暗条件下不同氮源对培养液中 NO_2^- 浓度的影响

Fig. 3 Effect of different nitrogenous compounds on the variation of NO_2^- concentration in the medium of *M. aeruginosa* under darkness

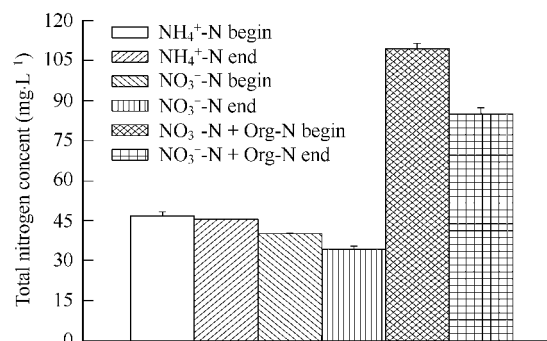


图4 黑暗条件不同氮源对含藻体系中总氮含量的影响

Fig. 4 Effect of different nitrogenous compounds on the variation of total nitrogen concentration in medium containing *M. aeruginosa* under darkness

黑暗培养时, 铜绿微囊藻利用细胞内储存的物质进行呼吸或发酵产生能量来维持其生理需求, 会消耗大量的氧气, 从而造成培养液氧化还原电位大幅度下降。本实验室研究已证明, 铜绿微囊藻在黑暗光照交替培养条件下, 培养液中的氧化还原电位呈波浪性变化, 黑暗时电位下降, 且藻密度越大下降幅度越大。在黑暗光照交替培养条件下, 初始藻密度为 $3 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 氧化还原电位的最低值达到 +150 mV 左右, 初始藻密度为 $6 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 培养液中氧化还原电位最低值为 -450 mV 左右。本试验设置藻密度初始值为 $8 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$, 持续黑暗培养, 氧化还原电位较黑暗光照交替培养更低, 有利于反硝化作用的进行, 因此使铜绿微囊藻利用 NO_3^- 为呼吸作用的最终电子受体, 把硝酸还原成亚硝酸甚至氮气这一过程。在 NO_3^- -N + Org-N 为氮源的培养液中, 反硝化作用最强烈, 因此, 培养液中 NO_2^- 浓度较 NO_3^- -N 为氮源时低(图3), 同时, 反硝化作用产生的含氮中间产物可能对铜绿微囊藻产生毒性作用, 导致其密度下降程度最大(图1)。

3 结论

本试验进行了黑暗条件下不同氮源对蓝藻水华的优势种铜绿微囊藻的生长及对培养液中 pH 值的影响的研究。黑暗条件下铜绿微囊藻进行呼吸作用, 放出 CO_2 使培养液 pH 值降低, 同时发生反硝化作用, 但在不同氮源条件下, 培养液中 pH 值降低程度不同, 其进行反硝化的能力也有较大差异, 在有机氮和硝态氮同时存在时, 铜绿微囊藻反硝化能力最强, 其产生的中间代谢产物可能对铜绿微囊藻产生不利影响。

铜绿微囊藻是蓝藻水华的优势种, 水华暴发时藻密度较大, 黑暗条件下, 铜绿微囊藻消耗水体中氧气, 造成水体氧化还原电位大幅度下降, 有利于反硝化作用的进行, 从而使部分氮源转化为氮气溢出水体, 造成水体中总氮含量降低。因此, 在富营养化水体藻华暴发过程中, 反硝化过程值得关注。

References:

- [1] Kyong Ha, Eun-Ah Cho, Hyun-Woo Kim, et al. Microcystis bloom formation in the lower Nakdong River, South Korea; importance of hydrodynamics and nutrient loading. Marine and Freshwater Research, 1999, 50(1): 89-94.
- [2] Shapiro J. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO_2 and pH. International Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie, 1990, 24(1): 38-54.
- [3] Jin X C, Li Z C, Zheng S F, et al. Studies on the growth characteristics of *Microcystis aeruginosa*. Research of Environmental Sciences, 2004, 17:

52—54, 61.

- [4] Qiu B S, Gao K S. Effects of CO₂ enrichment on the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (cyanophyceae): Physiological responses and relationships with the availability of dissolved inorganic carbon. *J. Phycol.* 2002, 38: 721—729.
- [5] Joseph Shapiro. The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes. *Freshwater Biology*, 1997, 37: 307—323.
- [6] Shapiro J. Blue-green dominance in lakes: The role and management significance of pH and CO₂. *International Revue der Gesamten Hydrobiologie*, 1984, 69(6): 765—780.
- [7] Shapiro J. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO₂ and pH. *International Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie*, 1990, 24 (1): 38—54.
- [8] Zhao P, Sun G C, Peng S L. Ecophysiological research on nitrogen nutrition of plant. *Ecologic Science*, 1998, 17(2): 37—42.
- [9] Isabel Muro-Pastor M, Francisco J. Florencio. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2003, 41: 595—603.
- [10] Jose M Garcia-Fernandez, Jesus Diez. Adaptive mechanisms of nitrogen and carbon assimilatory pathways in the marine cyanobacteria *Prochlorococcus*. *Research in Microbiology*, 2004, 155: 795—802.
- [11] Johnston N A L, Campagna V S, Hawkins P R, *et al.* Response of the Eastern Rainbowfish (*Melantaenio duboulay*) to Toxic *Microcystis aeruginosa* // Jones G J. *Cyanobacterial Research*. Australia: CSIRO Cataloguing-in-Publication Entry, 1994: 187—193.
- [12] Sahu J, Adhikary S P. Heterotrophic growth and pigment composition of four filamentous blue-green algae. *Arch. Hydrobiol.* 1982, Suppl. 63: 189—199.
- [13] Radwan S S, Al-Hasan R H. Oil Pollution and cyanobacteria. In: Whitton B. A. and Potts M. eds. *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, 2000, 307—319.
- [14] Kirkwood A E, Nalewajko C, Fulthorpe R R. Physiological characteristics of cyanobacteria in pulp and paper waste-treatment systems. *Journal of Applied Phycology*, 2003, 15: 325—335.
- [15] John C Meeks, Jeff Elhai, Teresa Thiel, *et al.* An overview of the genome of *Nostoc punctiform*, a multicellular symbiotic cyanobacterium. *Photosynthesis Research*, 2001, 70: 85—106.
- [16] Kong R Q, Xu X D, Hu Z Y. A TPR-family membrane protein gene is required for light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 219(1): 75—79.
- [17] Tredici M R, Margheri M C, Giovannetti L, *et al.* Heterotrophic metabolism and diazotrophic growth of *Nostoc* sp. from *Cycas circinalis*. *Plant and Soil*, 2005, 110(2): 199—206.
- [18] He X F, Ji L N. Studies of stability of ternary metal ion complexes formed by the anion of bicine and heteroaromatic N bases. *Journal of Molecular Science*, 2000, 26(1): 12—15.
- [19] Schlegel H G. *Common Microorganism*. Shanghai: Fudan University Press, 1990. 208—302.

参考文献:

- [3] 金相灿, 李兆春, 郑朔方, 等. 铜绿微囊藻生长特性研究. *环境科学研究*, 2004, 17: 52~54, 61
- [8] 赵平, 孙谷畴, 彭少麟. 植物氮素营养的生理生态学研究. *生态科学*, 1998, 17(2): 37~42
- [18] 贺小凤, 计亮年. Bicine 单电荷阴离子与芳香氮碱形成的三元金属离子混配合物的稳定性研究. *分子科学学报*, 2000, 16 (1): 12~15.
- [19] H. G. 施莱杰. 陆卫平, 周德庆, 郭杰炎, 等译. 见: H. G. 施莱杰主编: 普通微生物学. 上海: 复旦大学出版社, 1990. 208~302.