

# 铜绿微囊藻对亚硝态氮的利用

陈卫民, 张清敏, 戴树桂

(南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071)

**摘要:**通过室内培养,研究了不同亚硝态氮浓度对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)生长的影响和藻对亚硝态氮的利用,实验分析了水体中亚硝态氮、硝态氮和铵态氮浓度的变化,测定了铜绿微囊藻的生长曲线、藻细胞内亚硝态氮含量和藻亚硝酸氧化酶(NOR)。结果显示,在 10 mg  $\text{NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$  的处理组中,培养基中亚硝态氮和硝态氮浓度同时减少,说明铜绿微囊藻可以同时利用亚硝态氮和硝态氮;在 20 和 30 mg  $\text{NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$  的处理组中,随着藻的生长培养基中亚硝态氮的浓度减少,硝态氮浓度增加,而且电泳实验显示此培养条件下铜绿微囊藻能产生亚硝酸氧化酶,表明培养基中的亚硝态氮被亚硝酸氧化酶氧化为硝态氮。本实验也表明高浓度的亚硝态氮(大于 10 mg  $\text{NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ )能够抑制藻的生长。

**关键词:**铜绿微囊藻;亚硝态氮;硝态氮;亚硝酸氧化酶

**中图分类号:**X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)05-0989-04

## Utilization of Nitrite as a Nitrogen Source by *Microcystis aeruginosa*

CHEN Wei-min, ZHANG Qing-min, DAI Shu-gui

(College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** To investigate the effect of nitrite on growth of *Microcystis aeruginosa* and utilization of nitrite by cyanobacteria, the growth curve, the intracellular nitrite content and nitrite oxidoreductase (NOR) of *M. aeruginosa* under different nitrite concentration and the changes of concentrations of nitrite, nitrate and ammonium in the culture medium had been measured. Our results showed that both nitrite concentration and nitrate concentration decreased with cyanobacteria culturing in the medium containing 10 mg  $\text{NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ , meanwhile, intracellular nitrite concentration increased with increase of nitrite concentration in culture medium, indicated that *M. aeruginosa* could uptake nitrite and nitrate simultaneously, moreover, the increase of nitrite concentration could promote nitrite uptake. However, in medium of 20, 30 mg  $\text{NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ , the nitrate concentration increased with nitrite concentration decreasing, and NOR was observed, revealing the nitrite might be oxidized to nitrate by NOR. Our results also showed that the growth of cyanobacteria was inhibited under high nitrite concentrations (over 10 mg  $\text{NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

**Keywords:** *Microcystis aeruginosa*; nitrite; nitrate; nitrite oxidoreductase

由于工农业生产废水和生活污水大量排入水体,使其营养盐浓度不断升高,导致我国的许多水体经常爆发大面积的“水华”,给湖泊、水库等水环境及其生态系统带来严重影响<sup>[1-3]</sup>。在我国大部分富营养化水体中,铜绿微囊藻的数量和发生频率均占据一定优势<sup>[4]</sup>。铜绿微囊藻在湖泊中的异常增殖表明其具有适应环境的特殊机制。硝态氮和铵态氮对铜绿微囊藻生长的影响已经进行了大量的研究<sup>[5-6]</sup>,但是亚硝态氮对铜绿微囊藻生长的影响研究还很少。在水体环境中尤其在富营养化环境中,亚硝态氮由于硝化-反硝化作用和一些人为的因素能够在水体中大量聚集<sup>[7-10]</sup>,本实验为了有

效地研究铜绿微囊藻对亚硝态氮的利用、转化,将铜绿微囊藻加入到不同亚硝态氮浓度的培养基中进行光照培养,测定铜绿微囊藻的密度并绘制生长曲线,同时测定藻内亚硝态氮含量的变化和亚硝酸氧化酶,还测定了培养基中亚硝态氮、硝态氮和铵态氮浓度的变化,分析外源亚硝态氮对铜绿微囊藻生长的影响。这对于防治水库、湖泊等水体水华形成和探索铜绿微囊藻在富营养化条件下能形成优势藻的机理具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验藻种及接种

试验用铜绿微囊藻购自中国科学院武汉水生生物研究所。取一定量处于指数生长期的藻液,在 3 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 10 min,弃上清液,用 15 mg  $\cdot \text{L}^{-1}$  的碳酸氢钠溶液洗涤后离心。如此重复 3 次,用无菌水悬浮后用于接种,藻的起始密度在  $5 \times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$  左右。

收稿日期:2008-08-21

基金项目:天津大学-南开大学合作基金(AJ0013)

作者简介:陈卫民(1975—),男,内蒙古呼和浩特人,博士生,主要从事湖泊富营养化方面的研究。E-mail:chenwm\_env@yahoo.com.cn

通讯作者:戴树桂 E-mail:sgdai@public.tpt.tj.cn

## 1.2 试验设计

以 BG<sub>11</sub><sup>[11]</sup>培养基为基础,加入 NaNO<sub>2</sub> 形成 0:240、10:240、20:240、30 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup>:240 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup> 4 个处理组和 1 个参照(30 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup>:240 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup>)。在 1 L 锥形瓶内加入 500 mL 无菌培养基,接入藻种,参照中不接入藻种,放置在人工气候箱中,保持温度 25 ℃,光照强度 3 000 lx,光暗周期 12 h:12 h,每日振摇 3 次。每组做 3 个平行样。每日测定铜绿微囊藻细胞密度,每 3 d 测定培养基中硝态氮、亚硝态氮和铵态氮的浓度。在第 8 d,测定藻细胞内亚硝态氮含量和检测藻 NOR。

## 1.3 藻细胞计数

利用血球计数板显微计数。

## 1.4 硝态氮、亚硝态氮和铵态氮浓度的测定

取 5 mL 藻液,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液,用纳氏试剂光度法测定铵态氮,N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定亚硝态氮,用紫外分光光度法测定硝态氮<sup>[12]</sup>。

## 1.5 细胞内亚硝态氮含量的测定

每个处理培养 8 d 后,取 5 mL 藻液,在 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,去除培养液,藻体用 15 mg·L<sup>-1</sup> 的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液洗涤 2 遍,离心去除上清液,藻体用 10 mL 5% 的三氯乙酸悬浮,在冰浴中超声 10 min,然后放置在 45 ℃ 水浴中 30 min,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液进行 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 测定<sup>[12]</sup>。

## 1.6 铜绿微囊藻亚硝酸氧化酶(NOR)的检测

每个处理培养 8 d 后,取 5 mL 藻液,在 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,去除培养液,藻体用 50 mmol·L<sup>-1</sup> 脱氧胆酸钠处理,再用 50 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖离心分离,将得到的酶液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 铜绿微囊藻在不同亚硝态氮浓度下的生长情况

从图 1 中可以看出,在不同亚硝态氮浓度条件下,铜绿微囊藻的生长有显著差异,在亚硝态氮浓度为 10 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup> 的培养基中,铜绿微囊藻的生长没有受到亚硝态氮的影响。随着培养基中亚硝态氮浓度的进一步增加,亚硝态氮对藻生长的抑制变得明显。从图 1 中也可看出,在高亚硝态氮浓度的培养基中,铜绿微囊藻不仅进入对数生长期的时间晚于低亚硝态氮浓度培养基中的藻,而且对数生长期持续的时间也短。

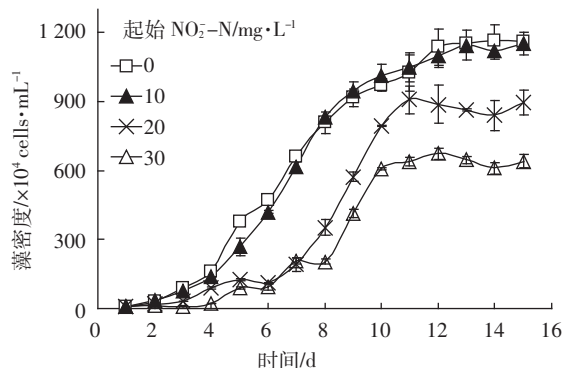


图 1 不同 NO<sub>2</sub>-N 浓度下铜绿微囊藻的生长曲线  
Figure 1 The growth curves of *M. aeruginosa* under different concentrations of NO<sub>2</sub>-N

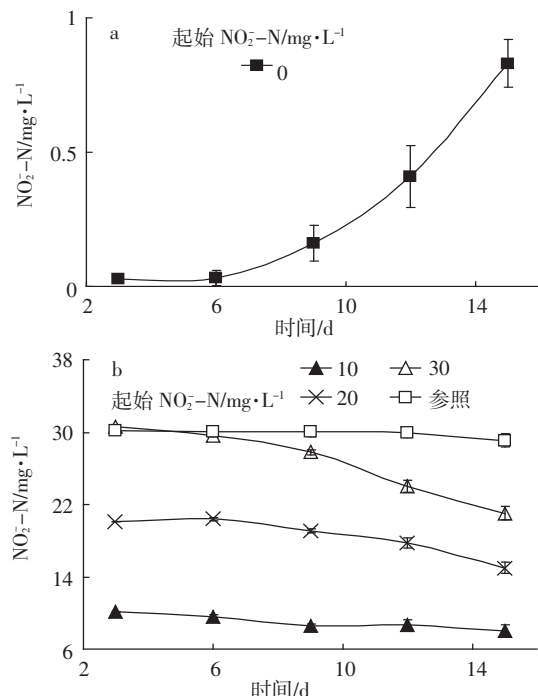
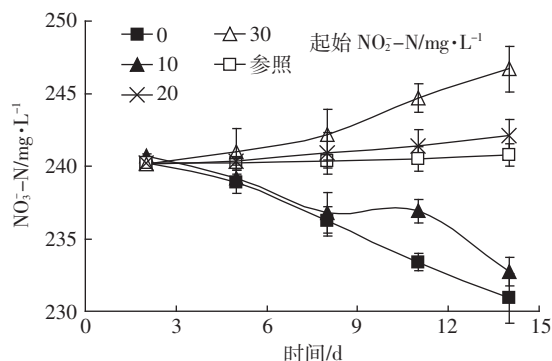
亚硝态氮能够抑制藻的生长,其抑藻机理国内外很多学者均作了多方面的研究。Sijbesma<sup>[14]</sup>和 Almeida<sup>[15]</sup>认为亚硝态氮能增加细胞膜的质子渗透性,导致细胞膜两侧的质子梯度较低,从而影响三磷酸腺苷酶(ATP 酶)的活性,降低能量转化的效率。Rottenberg<sup>[16]</sup>的研究报道亚硝态氮离子可以阻止细胞中 ATP 的合成,加快 ATP 的水解,抑制多种由 ATP 酶催化的反应。实验研究表明,在亚硝态氮浓度高于 10 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup> 的培养基中,铜绿微囊藻的生长受到明显的抑制,分析原因,可能是上述的一种或几种因素共同作用的结果。

### 2.2 培养基中硝态氮、亚硝态氮和铵态氮浓度的变化

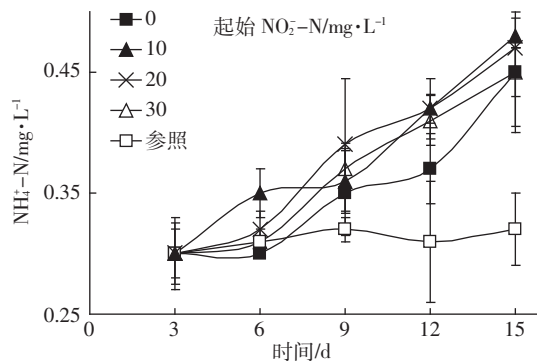
由图 2 可以看出,在初始亚硝态氮浓度为 0 的培养基中,培养基中亚硝态氮的浓度随着实验的进行而增加,实验结束时增加到 0.83 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup>。相反在初始亚硝态氮浓度为 10、20、30 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup> 的培养基中,铜绿微囊藻加入后培养基中的亚硝态氮浓度分别减少了 2.10、5.09、9.54 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup>。参照中亚硝态氮浓度在实验结束时有轻微的减少。

图 3 显示,实验结束时,初始亚硝态氮浓度为 0、10 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup> 的培养基中,硝态氮的浓度分别减少了 9.53、8.09 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup>;在初始亚硝态氮浓度为 20、30 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup> 的培养基中,硝态氮的浓度增加了 1.90、6.64 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N·L<sup>-1</sup>,参照中硝态氮浓度有轻微的增加。在所有处理组的培养基中,铵态氮浓度随着铜绿微囊藻的生长而轻微增加,参照中铵态氮浓度没有明显的变化(图 4)。

在实验中,亚硝态氮浓度为 0 的培养基中,亚硝态氮浓度的增加与文献中报道的在以硝态氮为氮源条件下,培养基中亚硝态氮浓度随藻的生长而增加的结论相一致<sup>[17]</sup>。其原因可能是由于藻对硝态氮的利

图2 培养基中  $\text{NO}_2\text{-N}$  浓度的变化Figure 2 The changes of concentration of  $\text{NO}_2\text{-N}$  in cultural medium图3 培养基中  $\text{NO}_3\text{-N}$  浓度的变化Figure 3 The changes of concentration of  $\text{NO}_3\text{-N}$  in cultural medium

用形式造成的:硝态氮进入藻体内先由硝酸还原酶还原成亚硝态氮,然后再通过亚硝酸还原酶和谷氨酸合成酶最后合成有机物质。细胞内的一些亚硝态氮会随着藻的生长被释放到藻体外<sup>[18]</sup>。硝态氮和亚硝态氮作为氮源的两种存在的形式,可以被藻同时利用<sup>[19-20]</sup>,初始亚硝态氮浓度为 10  $\text{mg}\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$  的培养基中硝态氮浓度和亚硝态氮浓度同时减少的现象明显支持这一结论。但是在 20, 30  $\text{mg}\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$  的培养基中,铜绿微囊藻的加入导致培养基中亚硝态氮浓度减少的同时硝态氮浓度明显增加。分析原因,可能是培养基中亚硝态氮氧化为硝态氮的速度大于铜绿微囊藻利用硝态氮的速度造成的。参照中的硝态氮浓度和亚硝

图4 培养基中  $\text{NH}_4\text{-N}$  浓度的变化Figure 4 The changes of concentration of  $\text{NH}_4\text{-N}$  in cultural medium

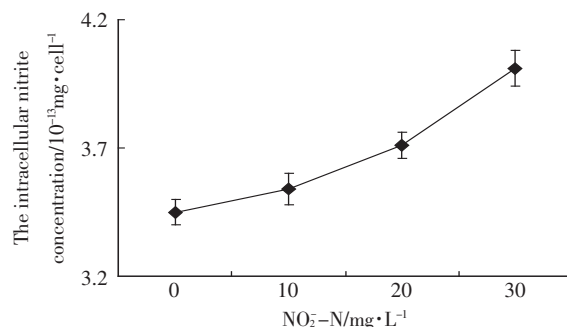
态氮浓度没有明显的变化,由此推断,在亚硝态氮氧化为硝态氮的过程中,铜绿微囊藻起到了关键作用。

### 2.3 细胞内亚硝态氮含量的变化

如上所述,培养基中亚硝态氮浓度的减少可能是由铜绿微囊藻的直接利用和氧化造成的。本研究中,为了更加清楚地分析铜绿微囊藻对亚硝态氮的直接利用,因此观察了藻细胞内亚硝态氮含量的变化。亚硝态氮可以通过特定蛋白质载体的运输或通过自由扩散的方式进入细胞内<sup>[21-22]</sup>。图5显示,培养基中亚硝态氮浓度对铜绿微囊藻细胞内亚硝态氮含量有促进作用,随培养基中亚硝态氮浓度的增加(10、20、30  $\text{mg}\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ ),藻细胞内亚硝态氮含量分别增加了2.6%、7.5%和16.2%。由此推断,铜绿微囊藻可以直接利用培养基中的亚硝态氮,并且在一定浓度范围内,培养基中亚硝态氮浓度越高,藻直接利用的亚硝态氮就越多。

### 2.4 铜绿微囊藻 NOR 的 SDS-PAGE 电泳

NOR 能够以  $\text{O}_2$  为电子受体把亚硝态氮氧化为硝态氮<sup>[10]</sup>。从图6可以看出,初始亚硝态氮浓度为 10、20、30  $\text{mg}\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组的谱带在 35 kDa、65 kDa 和 110 kDa 附近都有较多的蛋白质存在。由于亚硝态氮氧

图5 不同  $\text{NO}_2\text{-N}$  浓度下铜绿微囊藻的细胞内亚硝态氮含量Figure 5 Intracellular nitrite contents of *M. aeruginosa* under different concentrations of  $\text{NO}_2\text{-N}$

化酶在脱氧胆酸钠处理后是由 116~130 kDa、65 kDa 和 32 kDa 的 3 个亚单位构成的复合酶, 所以电泳图谱证明了提取酶液中的亚硝酸氧化酶的存在。同时图 3 也显示, 在亚硝态氮浓度越高的培养基中, 硝态氮浓度增加的越快, 表明亚硝态氮能够诱导 NOR 或者激活 NOR 酶, 使 NOR 活性增强。

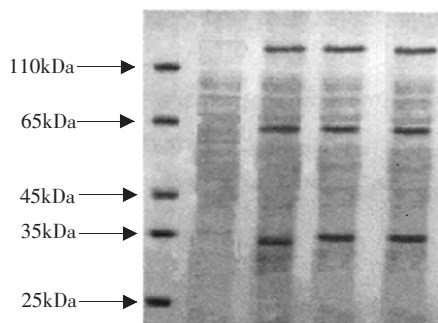


图 6 亚硝酸氧化酶(NOR)SDS-PAGE 电泳图  
Figure 6 The SDS-PAGE electrophoretograms of NOR

### 3 结论

实验研究了铜绿微囊藻对亚硝态氮的利用。结果表明, 在亚硝态氮和硝态氮为氮源的情况下, 铜绿微囊藻一方面可以同时利用亚硝态氮和硝态氮作为氮源, 另一方面由于亚硝态氮的出现诱导藻产生亚硝酸氧化酶, 把培养基中的亚硝态氮氧化为硝态氮。溶液中高浓度的亚硝态氮不利于藻的生长, 亚硝酸氧化酶的出现能够快速降低溶液中亚硝态氮浓度, 从而降低亚硝态氮对藻的危害, 对藻在高亚硝态氮条件下生存起到极大的作用。对于防治水库、湖泊等水体水华形成和探索铜绿微囊藻在富营养化条件下能形成优势藻的机理具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Vasconcelos V M, Pereira E. Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant(Portugal)[J]. *Wat Res*, 2001, 35: 1354-1357.
- [2] Codd G A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality and the prioritization of eutrophication control[J]. *Ecological Engineering*, 2000, 16: 51-60.
- [3] 沈建国, 章建. 微囊藻毒素的污染现状、毒性机理和检测方法[J]. 预防医学情报杂志, 2001, 17(1): 10-16.  
SHEN Jian-guo, ZHANG Jian. The pollution status, toxicity mechanism and detection measure of microcystins[J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 2001, 17(1): 10-16.
- [4] 金相灿. 中国湖泊环境[M]. 北京: 海洋出版社, 1995.  
JIN Xiang-can. Chinese lake environment[M]. Beijing: Ocean Press, 1995.
- [5] 孔倩, 杨柳燕, 肖琳, 等. 黑暗下不同氮源对铜绿微囊藻生长和 pH 的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(5): 2060-2064.  
KONG Qian, YANG Liu-yan, XIAO Lin, et al. Effect of different nitro-

- gen forms on the growth of *Microcystis aeruginosa* and pH in the medium under darkness[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(5): 2060-2064.
- [6] 许海, 杨林章, 刘兆普. 铜绿微囊藻和斜生栅藻的氮营养动力学特征[J]. 环境科学研究, 2008, 21(1): 69-73.  
XU Hai, YANG Lin-zhang, LIU Zhao-pu. Dynamics study on the effect of nitrogen on the growth of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus*[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2008, 21(1): 69-73.
- [7] Gil K I, Choi E S. Modelling of inhibition of nitrite oxidation in biological nitrification processes by free ammonia[J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23: 2021-2026.
- [8] Nijhof M, Klapwijk A. Diffusional transport mechanisms and biofilm nitrification characteristics influencing nitrite levels in nitrifying trickling filter effluents[J]. *Wat Res*, 1995, 29(10): 2287-2292.
- [9] Braid W, Ong S K. Decomposition of nitrite under various pH and aeration conditions[J]. *Water Air and Soil Pollution*, 2000, 118: 13-26.
- [10] Razumov V A, Tyutyunova F I. Nitrite contamination of the Moskva river: causes and effects[J]. *Water Resources*, 2001, 28: 324-334.
- [11] Saito K, Hiroshi Ishii, Nishida F. Purification of microcystins by DEAE and C<sub>18</sub> cartridge chromatography[J]. *Toxicon*, 2002, 40: 97-101.
- [12] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 200-235, 670-671.  
Chinese EPA. Monitoring and analysis methods water and wastewater[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 200-235, 670-671.
- [13] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 54-87.  
GUO Yao-jun. Protein electrophoresis technology[M]. Beijing: Science press, 1999: 54-87.
- [14] Sijbesma W F H, Almeida J S, Reis M A M, et al. Uncoupling effect of nitrite during denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: an in vivo P-NMR study[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 52(1): 176-192.
- [15] Almeida J S, Júlio S M, Reis M A M, et al. Nitrite inhibition of denitrification by *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995a, 46: 194-201.
- [16] Rottenberg H. Decoupling of oxidative phosphorylation and photophosphorylation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1018: 1-17.
- [17] Hu H, Zhang X. Nitrite utilization by *Chaetoceros mulleri* under elevated CO<sub>2</sub> concentration[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, DOI 10. 1007/s11274-007-9553-x.
- [18] Flynn K J, Flynn K. Release of nitrite by marine dinoflagellates: development of a mathematical simulation[J]. *Marine Biollgy*, 1998, 130: 455-470.
- [19] Florencio J, Vega J M. Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Planta*, 1983, 158: 288-293.
- [20] Garbayo I, León R, Vigar J, et al. Inhibition of nitrate consumption by nitrite in entrapped *Chlamydomonas reinhardtii* cells[J]. *Bioresource Technol*, 2002, 81: 207-215.
- [21] Brunswick P, Cresswell C F. Nitrite uptake into intact pea chloroplasts. I. kinetics and relationship with nitrite assimilation[J]. *Plant Physiol*, 1988, 86: 378-383.
- [22] Neubauer H, Pantel I, Gotz F. Molecular characterization of the nitrite-reducing system of *Staphylococcus carnosus*[J]. *J Bacteriol*, 1999, 181: 1481-1488.