

微藻无机氮利用过程中的稳定氮同位素分馏

李海涛¹, 吴沿友^{2,*}

(1. 贵州农业职业学院, 贵阳 551400;

2. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550081)

摘要: 选用两种 $\delta^{15}\text{N}$ 差异显著的铵态氮和硝态氮, 分别设置不同浓度的铵态氮和硝态氮来处理莱茵衣藻和蛋白核小球藻, 通过分析微藻的稳定氮同位素组成变化, 来研究微藻利用不同浓度、不同形态无机氮过程中的稳定氮同位素分馏特征。结果显示, 在未添加无机氮的条件下, 微藻利用有机氮时, 生长缓慢, 稳定氮同位素基本上不存在分馏; 在添加低浓度无机氮 ($\leq 2.0 \text{ mmol/L}$) 时, 微藻的生长和稳定氮同位素分馏都随着无机氮浓度的增加而增加; 而添加高浓度无机氮 ($>2.0 \text{ mmol/L}$) 时, 微藻的生长趋于稳定, 铵态氮条件下的微藻稳定氮同位素分馏继续加大, 而硝态氮条件下的微藻稳定氮同位素分馏反而减小, 可能与此时微藻硝酸还原酶的活力减小有关。

关键词: 莱茵衣藻; 蛋白核小球藻; 铵态氮; 硝态氮; 氮同位素组成

中图分类号: P512 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-9250(2019)06-0839-05 **doi:** 10.14050/j.cnki.1672-9250.2019.47.137

微藻是指一类生活在水中, 营浮游生活方式的微小植物的总称, 通常指浮游藻类。它不是物种分类学上的单位, 而只是一个生态学单位。微藻可利用的氮源较广, 包括无机氮源(铵态氮、硝态氮)和有机氮源(氨基酸、酵母膏、尿素)^[1]。一般情况下, 微藻可吸收利用的氮源以铵态氮和硝态氮等无机氮为主。

由于氮的赋存形态较多, 从-3价的 NH_4^+ 到+5价的 NO_3^- 都有; 相应地不同形态的氮同位素组成差异也比较大, 其 $\delta^{15}\text{N}$ 一般在-20‰~+30‰之间。自20世纪70年代以来, 同位素技术陆续在光合作用途径、光能利用效率、水分利用效率、无机碳利用份额、生物溶蚀等领域得到了广泛应用^[2-8]。

自然条件下, 铵态氮和硝态氮的稳定氮同位素组成差异较大, 再加上不同形态的无机氮在生物体中的运移过程不同, 最终造成植物体的稳定氮同位素组成差异明显。这为本研究从稳定氮同位素的角度来研究微藻吸收利用不同形态无机氮过程中的稳定氮同位素分馏特征提供了有力条件, 该研究成果将在微藻氮代谢及指示水体环境变化研究领域具有重要意义。

1 材料方法

本研究选用的微藻是莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, FACHB-479) 和蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa*, FACHB-5), 均来源于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库 (Freshwater Algae Culture Collection of the Institute of Hydrobiology, FACHB)。培养地点在中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室的人工温室。

本研究选用两种 $\delta^{15}\text{N}$ 差异显著的铵态氮和硝态氮, 分别设置不同浓度的铵态氮和硝态氮作为无机氮源, 以此来识别微藻利用不同种类无机氮过程中的氮分馏特征。无机氮(分为两组: 硝酸钠和氯化铵)浓度梯度设置: 0、0.2、2.0、20.0 mmol/L, 所添加的标记硝酸钠的 $\delta^{15}\text{N}$ 为 $23.4\text{‰} \pm 0.1\text{‰}$; 所添加的标记氯化铵的 $\delta^{15}\text{N}$ 为 $1.4\text{‰} \pm 0.1\text{‰}$ 。微藻培养采用改进的 SE(去除含氮组分)液体培养基^[9]。培养条件如下: 光照强度, $150 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$; 光暗周期, 12 h/12 h; 温度, $22.0 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 。通过添加少量 NaOH 或 HCl 调节初始 pH 在 8.00 ± 0.05 。实验处理 4 天, 通过不断进行继代培养以保持微藻旺盛的

收稿日期: 2019-07-12; 改回日期: 2019-07-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(40973060、U1612441-2)。

第一作者简介: 李海涛(1982-), 男, 博士, 研究方向为生物地球化学。E-mail: lisea02@126.com.

* 通讯作者: 吴沿友(1966-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为生物地球化学。E-mail: wuyanyou@mail.gyig.ac.cn.

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

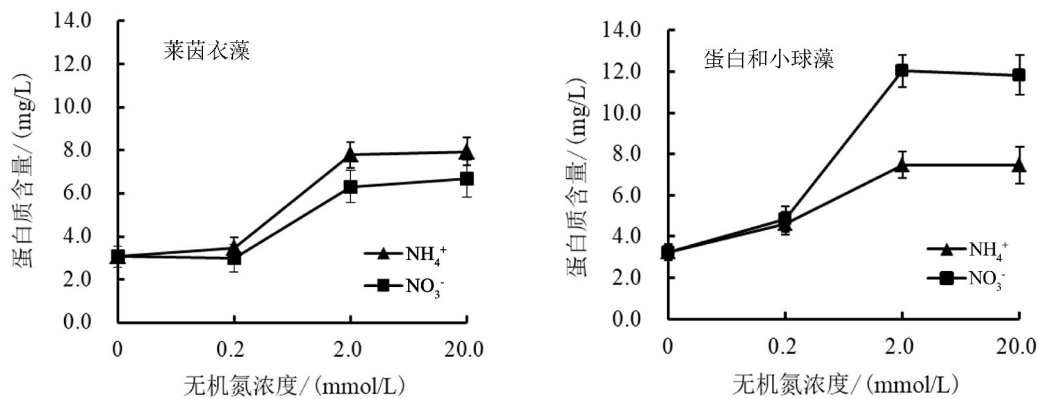


图1 无机氮处理下的微藻蛋白质含量

Fig.1 The protein contents of microalgae under treatments of inorganic nitrogen

生长状态。为降低误差,硝酸钠组和氯化铵组同时进行同批次培养,并控制各个实验处理开始时的微藻接种量,以便降低微藻细胞浓度差异所带来的影响。

1.1 微藻生物量的测定

根据微藻的生长特征,本研究生物量指标的获取采用测定微藻培养液蛋白质含量的方式来表征,具体测定方法采用考马斯亮蓝比色法^[10]。

1.2 微藻稳定氮同位素的测定

离心收集微藻样品,使用冷冻干燥法获得干燥的微藻样品,采用气体同位素质谱分析法(MAT-252)测定氮同位素比值,分析结果以相对于国际标准-大气的 $\delta^{15}\text{N}$ 为基准(式1)。

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = [(R_{\text{样品}}/R_{\text{标准}}) - 1] \times 1000 \quad (1)$$

式中, $R_{\text{样品}}$ 为样品的 ^{15}N 与 ^{14}N 的比值; $R_{\text{标准}}$ 为标准品的 ^{15}N 与 ^{14}N 的比值。

1.3 微藻稳定氮同位素组成的校正

鉴于微藻生长的特殊性,很难分离在实验处理条件下新生成的微藻和初始接种的微藻,造成最后测得的藻体稳定氮同位素组成是一种包含处理前后的所有微藻的混合物。为了更加准确反映实验处理过程中新生成的微藻稳定氮同位素组成,本研究采用微藻稳定氮同位素校正模型。

根据微藻稳定氮同位素样品的特点,结合培养前后的微藻生物量增殖情况和培养前后的微藻氮同位素组成变化,假定微藻利用体内有机氮不发生氮同位素的分馏(本文已证实),我们建立了如下方程:

$$P_0 \times \delta^{15}\text{N}_0 + (P_4 - P_0) \times \delta^{15}\text{N}_A = P_4 \times \delta^{15}\text{N}_E \quad (2)$$

式中, P_0 为初始接种时的微藻蛋白质含量; P_4 为实

验处理4天测得的微藻蛋白质含量; $\delta^{15}\text{N}_0$ 为初始接种的微藻稳定氮同位素组成; $\delta^{15}\text{N}_E$ 为实验处理4天测得的微藻稳定氮同位素组成; $\delta^{15}\text{N}_A$ 为实验处理新生成的微藻稳定氮同位素组成。

本研究后续部分的新生成微藻的稳定氮同位素组成数据都是基于此模型校正后的数据。

2 结果

2.1 不同氮源对微藻生长的影响

从不同浓度无机氮处理下的微藻生长状况来看,随着添加的无机氮浓度的增加,莱茵衣藻和蛋白核小球藻的生物量都在不断增加(图1)。从不同形态无机氮对微藻生长的促进程度来看,铵态氮更利于促进莱茵衣藻的生长;而硝态氮对蛋白核小球藻生长的促进作用更强。整体看来,添加无机氮能够促进微藻生长。在高浓度下,两种藻类生长趋于稳定。

2.2 微藻稳定氮同位素组成的变化

本研究所添加的两种无机氮的稳定氮同位素组成差异较大, $\delta^{15}\text{N-NH}_4^+$ 为 $1.4\text{‰} \pm 0.1\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ 为 $23.4\text{‰} \pm 0.1\text{‰}$,从处理后的新生成微藻的稳定氮同位素数据来看,微藻 $\delta^{15}\text{N}$ 组成受所添加无机氮的影响较大(表1)。

铵态氮处理下,随着添加氯化铵浓度的增加,新生成微藻的稳定氮同位素组成呈越来越偏负的趋势。硝态氮处理下,随着添加硝酸钠浓度的增加,新生成微藻的稳定氮同位素组成呈先偏正后回落的趋势;在添加2.0 mmol/L硝酸钠的条件下,微藻的 $\delta^{15}\text{N}$ 接近所添加的 $\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$,再提高添加硝酸钠的浓度,新生成微藻的 $\delta^{15}\text{N}$ 反而急剧下降,这

表1 不同无机氮处理下的新生微藻的稳定氮同位素组成
Table 1 The stable nitrogen isotope compositions of microalgae under different inorganic nitrogen treatments

无机氮浓度/ (mmol/L)	莱茵衣藻稳定氮 同位素组成		蛋白核小球藻稳定 氮同位素组成	
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻
	‰			
0	7.6±0.3	7.6±0.3	2.5±0.3	2.5±0.3
0.2	6.1±0.2	11.6±0.4	5.0±0.3	13.4±0.4
2.0	3.6±0.5	24.2±0.3	-1.1±0.2	24.8±0.3
20.0	-3.2±0.3	10.6±0.5	-2.3±0.2	12.8±0.4

可能与硝态氮的代谢途径有关。

2.3 微藻稳定氮同位素分馏特征

实验初始接种的同一条件下培养的微藻稳定氮同位素组成:莱茵衣藻的 $\delta^{15}\text{N}$ 为 $7.2\text{‰}\pm 0.4\text{‰}$; 蛋白核小球藻的 $\delta^{15}\text{N}$ 为 $2.2\text{‰}\pm 0.4\text{‰}$ 。根据初始接种时的微藻稳定氮同位素组成和新生成的微藻稳定氮同位素组成(表1),计算各处理条件下的微藻稳定氮同位素分馏(表2)。

表2 不同无机氮处理下的微藻稳定氮同位素分馏

Table 2 The stable nitrogen isotope fractionation of microalgae under different inorganic nitrogen treatments

无机氮浓度/ (mmol/L)	莱茵衣藻稳定氮 同位素分馏		蛋白核小球藻稳定 氮同位素分馏	
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻
	‰			
0	0.4	0.4	0.3	0.3
0.2	1.1	4.4	2.8	11.3
2.0	3.6	17.0	3.3	22.6
20.0	10.4	3.4	4.4	10.7

由表2可以看出,在未添加无机氮的空白条件下,不论是新生成的莱茵衣藻还是新生成的蛋白核小球藻,它们的稳定氮同位素基本上都不存在分馏。随着添加铵态氮浓度的增加,新生成微藻的稳定氮同位素分馏程度不断加大;而微藻的稳定氮同位素分馏随添加硝态氮浓度的增加都存在先上升后下降的趋势。

3 讨论

从以上实验结果可以发现,不论莱茵衣藻还是蛋白核小球藻,它们的生物量及微藻稳定氮同位素组成,都在添加 2.0 mmol/L 的无机氮条件下存在拐点,且不论是添加铵态氮还是硝态氮。它们之间存在很好的一致性。

由于氮是叶绿素的重要组成成分^[11-12],植物氮的供应是否丰缺通常影响叶绿素的变化。一般

情况下,适当增加氮的供应量能明显促进微藻的增长^[13],但是,高浓度的铵态氮对大多数植物普遍存在铵盐毒害现象^[14-15]。本研究发现在添加低浓度铵态氮的条件下(≤ 2.0 mmol/L),微藻的生长随添加铵态氮浓度的提高而增长;而添加高浓度的铵态氮使微藻的生长趋稳。这是因为随着铵根离子的吸收和同化,这个过程不断释放出 H⁺,造成微藻生长环境被迅速酸化^[16-17],它将快速降低到细胞正常生长所能耐受的最低 pH,此时,细胞将不能进行正常生长。已有研究认为 pH 对微藻细胞生长的影响主要是通过引起细胞膜电荷的变化和改变营养物质的离子化程度来影响细胞对营养物质的吸收,或者是影响细胞内多种酶的活性,最终抑制微藻的生长^[18-19]。因此,在铵盐浓度达到 20.0 mmol/L,抑制作用与促进作用相抵消,致使微藻的生长趋稳。而且,在添加高浓度的硝态氮处理下,微藻的生长趋于稳定,这可能是高浓度无机氮的促进与高浓度硝酸盐对硝酸还原酶的反馈抑制相对冲的结果^[20]。

植物的稳定氮同位素组成取决于其所吸收利用的氮源类型、氮浓度及生物酶活性等因素^[20]。植物在同化铵态氮过程中会发生氮同位素分馏现象,尤其在铵态氮作为唯一氮源的水培条件下,随着添加铵态氮浓度的增加,在遭受胁迫的逆境条件下,植物同化氮的能力下降,反应速率下降,由此带来对无机氮的选择性加大,导致了氮同位素分馏的增加^[21-24]。因此,对铵毒害比较敏感的植物通常亏损¹⁵N^[21-22]。

硝态氮处理下,随着添加硝酸钠浓度的增加,新生成微藻的稳定氮同位素组成存在抛物线变化的趋势,这可能与硝态氮的代谢途径有关,尤其在高浓度硝酸盐条件下,莱茵衣藻和蛋白核小球藻同时遭受着盐胁迫^[25]和硝酸还原酶的抑制^[20],最终影响了微藻对无机氮的吸收利用。

需要说明的是,在未添加无机氮的空白条件下,新生成的莱茵衣藻和蛋白核小球藻只利用来自改进的 SE 培养液中的土壤提取液的有机氮,它们的稳定氮同位素基本上都不存在分馏。这表明微藻吸收利用培养液中的有机氮的过程不存在稳定氮同位素分馏。

4 结论

1) 在未添加无机氮的条件下,微藻主要利用 SE

培养基中的微量有机氮,微藻生长缓慢,稳定氮同位素基本上不存在分馏。

2)随着添加无机氮(≤ 2.0 mmol/L)浓度的增加,微藻的生长和稳定氮同位素分馏都呈增加趋

势;添加过高浓度无机氮(>2.0 mmol/L),微藻的生长趋于稳定,铵态氮条件下的微藻稳定氮同位素分馏继续加大,而硝态氮条件下的微藻稳定氮同位素分馏反而减小。

参 考 文 献

- [1] Li X, Hu H Y, Gan K, et al. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources[J]. Ecological Engineering, 2010, 36(4): 379-381.
- [2] Whelan T, Sackett W M, Benedict C R. Enzymatic fractionation of carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C_4 plants[J]. Plant Physiology, 1973, 51(6): 1051-1054.
- [3] Ehleringer J R, Field C B, Lin Z, et al. Leaf carbon isotope and mineral composition in subtropical plants along an irradiance cline[J]. Oecologia, 1986, 70(4): 520-526.
- [4] Ehleringer J R, Monson R K. Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1993, 24(1): 411-439.
- [5] Marshall J D, Zhang J W. Carbon isotope discrimination and water-use efficiency in native plants of the North-Central rockies[J]. Ecology, 1994, 75(7): 1887-1895.
- [6] Wu Y Y, Xing D K. Effect of bicarbonate treatment on photosynthetic assimilation of inorganic carbon in two plant species of Moraceae[J]. Photosynthetica, 2012, 50(4): 587-594.
- [7] Xie T X, Wu Y Y. The biokarst system and its carbon sinks in response to pH changes: A simulation experiment with microalgae[J]. Geochemistry, Geophysics, Geosystems, 2017, 18(3): 827-843.
- [8] Li H T, Wu Y Y, Zhao L H. Effects of carbon anhydrase on utilization of bicarbonate in microalgae: A case study in Lake Hongfeng[J]. Acta Geochimica, 2018, 37(4): 519-525.
- [9] 门玉洁, 胡洪营, 李锋民. 芦苇化感组分对斜生栅藻 *Scenedesmus obliquus* 生长特性的影响[J]. 生态环境, 2006, 15(5): 925-929.
- [10] 郭颖娜, 孙卫. 蛋白质含量测定方法的比较[J]. 河北化工, 2008, 31(4): 36-37.
- [11] Hawkesford M, Horst W, Kichey T, et al. Chapter 6 - Functions of macronutrients. Marschners' s mineral nutrition of higher plants[M]. Academic press, 2012: 135-189.
- [12] Raven J A. Can plants rely on nitrate? [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8(7): 314-315.
- [13] 叶春, 邹国燕, 付子斌, 等. 总氮浓度对 3 种沉水植物生长的影响[J]. 环境科学学报, 2007, 27(5): 739-746.
- [14] Bittsánszky A, Pilinszky K, Gyulai Gábor, et al. Overcoming ammonium toxicity[J]. Plant Science, 2015, 231:184-190.
- [15] Britto D T, Kronzucker H J. NH_4^+ toxicity in higher plants: A critical review[J]. Journal of Plant Physiology, 2002, 159(6):567-584.
- [16] Avila A D L, Pereyra S M, Argiello J A. Nitrogen concentration and proportion of NH_4^+ -N affect potato cultivar response in solid and liquid media [J]. HortScience: A Publication of the American Society for Horticultural Science, 1998, 33(2):336-338.
- [17] Allen S, Thomas G E, Raven J A. Relative uptake rates of inorganic nutrients by NO_3^- and NH_4^+ grown *Ricinus Communis* and by two *Plantago Species*[J]. Journal of Experimental Botany, 1986, 37(177):419-428.
- [18] 张帆. 海洋富油微藻球等鞭金藻(*Isochrysisgalbana*) CCMM5001 的优化培养[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [19] 蒋汉明, 高坤山. 氮源及其浓度对三角褐指藻生长和脂肪酸组成的影响[J]. 水生生物学报, 2004, 28(5): 545-551.
- [20] Mariotti A, Moysé A. Nitrogen isotope fractionation associated with nitrate reductase activity and uptake of NO_3^- by Pearl Millet[J]. Plant Physiology, 1982, 69(4): 880-884.
- [21] Kalsits L A, Min X, Guy R D. Interspecific variation in leaf-root differences in $\delta^{15}N$ among three tree species grown with either nitrate or ammonium[J]. Trees, 2015. 29(4): 1069-1078.
- [22] Ariz I, Cruz C, Moran J F, et al. Depletion of the heaviest stable N isotope is associated with NH_4^+/NH_3 toxicity in NH_4^+ -fed plants[J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 1-13.
- [23] Handley L L, Robinson D, Forster B P, et al. Shoot $\delta^{15}N$ correlates with genotype and salt stress in barley[J]. Planta, 1997, 201(1):100-102.
- [24] Kalsits L A, Buschhaus H A, Guy R D. Nitrogen isotope discrimination as an integrated measure of nitrogen fluxes, assimilation and allocation in plants[J]. Physiologia Plantarum, 2014, 151(3):293-304.
- [25] Meloni D A, Oliva M A, Martínez C A, et al. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress[J]. Environmental and Experimental Botany, 2003, 49(1):69-76.

Stable Nitrogen Isotope Fractionation during the Utilization of Inorganic Nitrogen by Microalgae

LI Haitao¹, WU Yanyou²

(1. Guizhou Vocational College of Agriculture, Guiyang 551400, China;

2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550081, China)

Abstract: *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa* were treated under different concentrations of ammonium and nitrate with different $\delta^{15}\text{N}$. The characteristics of stable isotope fractionation were determined under different inorganic nitrogen treatments. The results showed that microalgae grew slowly and showed no stable nitrogen isotope fractionation when the organic nitrogen from the culture medium was the only available nitrogen source. In the case of low inorganic nitrogen concentration, the growth of microalgae and the stable nitrogen isotope fractionation increased when the inorganic nitrogen concentration was increased up to 2.0 mmol/L, in the case of high inorganic nitrogen concentration (>2.0 mmol/L), the growth of microalgae tended to be stable, the stable nitrogen isotope fractionation tended to increase during the utilization of ammonium, but decreased during the utilization of nitrate. These observations may be related to the decrease of nitrate reductase activity in microalgae.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; *Chlorella pyrenoidosa*; ammonium; nitrate; nitrogen isotope composition