

铵氮和硝氮胁迫下金鱼藻对氮素的利用

李靖¹, 敖新宇¹, 李宁云², 雷然¹, 陈玉惠^{1*}

(1. 西南林业大学 生命科学学院, 云南 昆明 650224; 2. 云南省林业科学院, 云南 昆明 650204)

摘要: 对剑湖优势沉水植物金鱼藻进行不同浓度的铵氮和硝氮耐受试验, 同时对植物体内的总氮、硝氮、铵氮和可溶性蛋白含量进行测定和比较。结果显示, 环境中的铵氮和硝氮直接影响金鱼藻对氮素的吸收利用, 和对照相比, 金鱼藻的总氮含量都有明显的升高, 但是浓度对总氮含量影响不明显。金鱼藻对环境铵氮较敏感, 环境中高浓度的铵氮会抑制氮素的转化。金鱼藻对硝氮的耐受能力较强, 环境中低浓度的硝氮会促进金鱼藻对硝氮的吸收和转化, 环境硝氮浓度达到 60 mg/L 时, 金鱼藻对硝氮的吸收达到饱和, 可溶性蛋白含量达到一定水平后不再随环境硝氮浓度增加而增加。

关键词: 金鱼藻; 硝氮; 铵氮; 总氮; 可溶性蛋白

中图分类号: Q949.746.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)02-0409-05

Nitrogen Usage of *Ceratophyllum demersum* under Ammonia Nitrogen and Nitrate Nitrogen Stress

LI Jing¹, AO Xin-yu¹, LI Ning-yun², LEI Ran¹, CHEN Yu-hui^{1*}

(1. Life Science college, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; 2. Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, China)

Abstract: *Ceratophyllum demersum*, which is widely distributed in Jian Lake in Yunnan Province, was made tolerate different ammonia and nitrate concentrations. The total nitrogen, nitrate nitrogen, ammonia nitrogen and soluble protein of *Ceratophyllum demersum* were detected and compared. The results showed that nitrogen in the environment source directly affected the absorption and utilization of nitrogen by *Ceratophyllum demersum*. There existed an obvious rise of its total nitrogen compared with the control, but the influence of the concentration on its total nitrogen content was not obvious. *Ceratophyllum demersum* was sensitive to environmental ammonia nitrogen. High concentration of environmental ammonium nitrogen inhibited the transformation of nitrogen. The tolerance ability of *Ceratophyllum demersum* to nitrate nitrogen was high and low concentrations of nitrate nitrogen in environment could promote its nitrate uptake and transformation. The nitrate absorption of *Ceratophyllum demersum* saturated when the nitrate nitrogen concentration of environment reached 60 mg/L. The content of soluble protein above a certain level no longer increased with the environmental nitrate concentration.

Key words: *Ceratophyllum demersum*; nitrate nitrogen; ammonia nitrogen; total nitrogen; soluble protein

沉水植物是湖泊生态系统的重要组成部分, 能吸收富营养化湖泊中的氮磷元素。某些植物的根茎还能够控制底泥中营养物的释放, 且在生长后期能较方便地去去除湖泊中过多的营养物, 具有重要的生态

收稿日期: 2011-09-28 修回日期: 2012-01-11

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)前期研究专项(2010CB434807)

作者简介: 李靖(1978—), 女, 讲师, 博士生, 主要从事植物生理生化研究, E-mail: lijing@swfu.edu.cn; * 通讯作者: 陈玉惠, 博士, 教授, 主要从事植物生理生化研究, E-mail: chen_yuhui@swfu.edu.cn。

功能和生态价值^[1-2]。金鱼藻是世界上广泛分布的一种沉水植物,属金鱼藻科金鱼藻属。由于在其主要的生活周期中沉水生长,生理上极端依赖于水环境,因而对水质变化的反应十分敏感,同时金鱼藻移栽极易成活,是研究富营养化对沉水植物影响的好材料。近年来,利用金鱼藻进行富营养化水体生态修复的相关报道较多^[3-6]。

不同水生植物吸收利用氮素的能力不同,氮素是主要的湖泊营养盐,通过测定不同条件下植物体内不同形态氮的积累量和环境条件的关系来研究植物对环境氮素的吸收和利用能力,国内外相关报道很少。剑湖湿地位于云南省西部大理州剑川县城东南 3 km 处,地处东经 99°55′,北纬 26°28′,海拔 2 186 m,属云南省高原重要的湿地类型^[7]。本文选择剑湖优势沉水植物金鱼藻作为受试植物进行室内模拟试验,研究不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻环境氮素的利用能力,为沉水植物对水环境的修复与治理提供良好的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)采自云南大理剑川剑湖。样品采集于 2011 年 5 月下旬,为金鱼藻生长较好季节。选取大小一致、生长较好的植株,洗净后放在自来水中培养一星期后用于室内耐受试验。

1.2 实验方法

1.2.1 金鱼藻不同硝氮和铵氮浓度下耐受 分别在 8 个不同铵氮(氯化铵)浓度下(以氮浓度计:0、2.5、5、10、20、40、60、80 mg/L)和 6 个不同硝氮(硝酸钾)浓度下(以氮浓度计:0、20、40、60、80、100 mg/L)对植株进行耐受试验。耐受试验所用塑料桶为统一定制,直径 50 cm,深度 40 cm。每个试验桶装 40 kg 水,放置大小一致的金鱼藻 30 株左右,让植株在自然光照射条件下生长,每个耐受浓度设 3 个平行。耐受 10 d 后收集植株,先用自来水将表面洗干净,再用蒸馏水冲洗后吸干表面水分,剪碎后混匀,一部分用于硝氮、铵氮和可溶性蛋白的测定;一部分放入烘箱里烘干粉碎后用于总氮测定。所有指标测定结果取 3 次测定结果平均值。

1.2.2 金鱼藻总氮含量的测定 采用凯氏定氮法进行测定^[8-9]。

准确称取处理好的样品 0.1 g 左右放入消化管中,加 5 g 的催化剂和 8 mL 浓硫酸后放入消化炉中进行消化(先在 200 °C 消化 30 min 再在 420 °C 消化 1.5 h),每个样品设 3 个重复。消化好的样品冷却后,采用 kjeltec2300 全自动定氮仪进行总氮测定,并记录数据。

1.2.3 金鱼藻硝氮含量的测定^[10-11] 准确称取 2 g 左右的材料,放入试管中,加入 10 mL 无离子水,置入沸水浴中提取 30 min。冷却后过滤至 25 mL 容量瓶中,并反复冲洗残渣,最后定容至刻度。共设 3 个重复。

吸取样品液 1 mL 于试管中,加入 $\varphi = 5\%$ 水杨酸-硫酸溶液 0.4 mL,混匀后置室温下 20 min,再慢慢加入 8.6 mL $\rho = 8\%$ NaOH 溶液,待冷却至室温后,以空白作参比(蒸馏水),在 410 nm 波长下测其光密度。在标准曲线上查得或用回归方程计算出硝态氮的浓度,再按以下公式计算其含量。样品中硝氮含量($\mu\text{g/g}$) = $D \times$ 样品提取液总量(mL) / [样品鲜重(g) \times 测定时样品液用量(mL)], D - 从标准曲线查得的硝氮的含量(μg)。

1.2.4 金鱼藻铵氮含量的测定 采用纳氏试剂比色法进行测定^[12]。

准确称取 2 g 左右的材料,置于研钵中加入适量的 pH = 1 的 H₂SO₄ 研细,在 3 500 r/min 下离心 20 min,取出上清液定容至 100 mL。取 50 mL 比色管,分别加入 5 mL 样品液,1.5 mL 纳氏试剂,1 mL 500 g/L 的酒石酸钾试剂,定容至 50 mL,混匀后置室温下显色 20 min,在 420 nm 波长处测定吸光度值。

根据样品液所测得的吸光度值,从标准曲线上查出铵氮的含量,按下式计算样品中铵氮含量。样品中铵氮含量($\mu\text{g/g}$) = $D \times$ 提取液总量(mL) / [样品鲜重(g) \times 取样品液用量(mL)], D - 从标准曲线查得的铵氮的含量(μg)。

1.2.5 金鱼藻可溶性蛋白含量的测定 采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[13]。准确称取 1 g 左右的材料,放入研钵中,加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.5)研成匀浆,离心(4 000 r/min,10 min),吸取上清,定容至 20 mL。准确吸取 1 mL 样品提取液,加 5 mL 考马斯亮蓝 G-250,充分混合,放置 5 min 后,测

定 595 nm 波长下吸光值, 在标准曲线上查得相应的蛋白质含量(μg), 按下式计算: 样品蛋白质含量($\mu\text{g}/\text{g}$ 鲜重) = (查得的蛋白质含量(μg) \times 提取液总体积(mL) / (样品鲜重(g) \times 测定时取用提取液的体积(mL))。

2 结果与分析

2.1 不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻总氮含量的变化

在不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻总氮含量的变化如图 1 所示, 随着环境铵氮和硝氮浓度的升高, 和对照相比, 金鱼藻总氮含量都在升高, 但是浓度对总氮含量的影响不大。在不同浓度的环境铵氮和硝氮条件下, 总氮含量差异不明显。

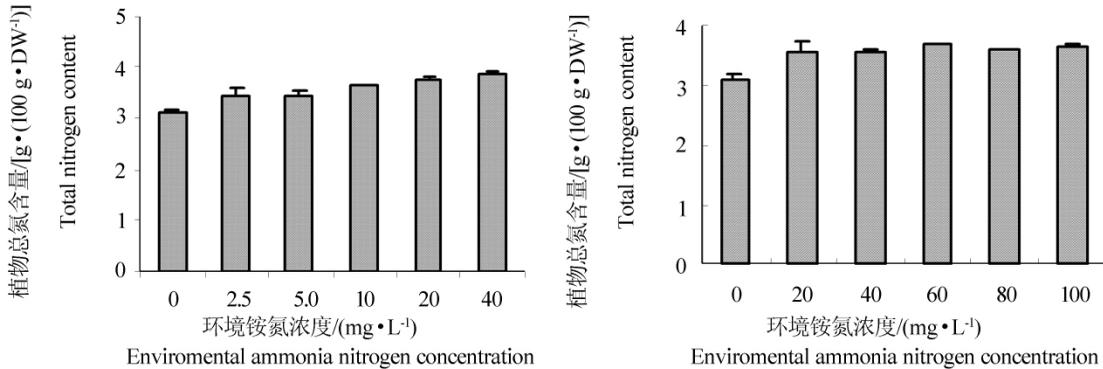


图 1 不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻总氮含量

Fig.1 Total nitrogen content of *Ceratophyllum demersum* under different ammonia nitrogen and nitrate nitrogen concentration

2.2 不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻硝氮含量的变化

在不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻硝氮含量的变化如图 2 所示, 随着环境铵氮浓度的升高, 金鱼藻的硝氮含量先升高后到达平台期。植物体可直接吸收硝氮, 植物体内的硝氮也可在硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的催化下, 转化为铵氮^[14-15]。因此植物硝氮含量的高低可在一定程度反映植物在特定环境下对硝氮的吸收和保存能力, 由于铵氮耐受实验环境中无硝氮吸收, 所以植物体内硝氮含量可间接反映植物在特定环境下对硝氮的转化能力, 硝氮含量越低, 转化能力相对较强。当环境中铵氮浓度小于 5 mg/L 时, 金鱼藻的硝氮含量相对较低, 说明在低浓度的铵氮(0 ~ 2.5 mg/L) 环境中硝氮的转化能力相对较强, 当环境中铵氮浓度达到 5 mg/L 时, 硝氮含量升高并达到平台期, 说明环境中铵氮对硝氮的转化具有一定的抑制作用, 所以硝氮含量增加。

随着环境硝氮浓度的升高, 金鱼藻的硝氮含量先升高后降低。当环境中硝氮浓度为 20 ~ 60 mg/L 时, 金鱼藻的硝氮含量较高, 说明此浓度范围内金鱼藻对硝氮的吸收能力较强。

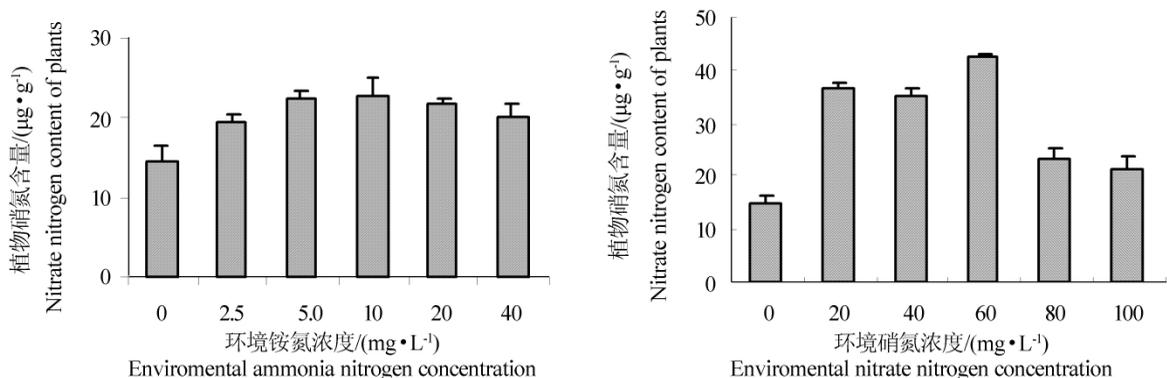


图 2 不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻硝氮含量

Fig.2 Nitrate nitrogen content of *Ceratophyllum demersum* under different ammonia nitrogen and nitrate nitrogen concentration

2.3 不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻铵氮含量的变化

在不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻铵氮含量的变化如图 3 所示, 随着环境铵氮浓度的升高, 金鱼藻铵

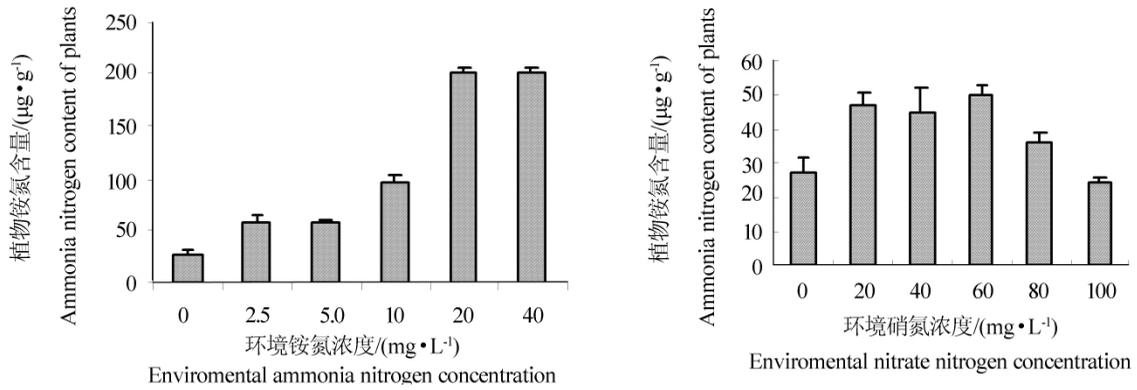


图 3 不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻铵氮含量

Fig. 3 Ammonia nitrogen content of *Ceratophyllum demersum* under different ammonia nitrogen and nitrate nitrogen concentration

氮含量也升高。植物体可直接吸收铵氮,也可在硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的催化下,将硝氮转化为铵氮。因此植物铵氮含量的高低可在一定程度上反映植物在特定环境下对铵氮的吸收和对硝氮的转化能力。当环境铵氮为 20 mg/L 和 40 mg/L 时,植物体内的铵氮含量升高非常明显,说明此浓度下金鱼藻对环境铵氮的吸收和保存能力较强。

随着环境硝氮浓度的升高,金鱼藻铵氮含量先升高后降低,当环境中硝氮浓度为 20 ~ 60 mg/L 时,金鱼藻的铵氮含量较高,说明此浓度范围内金鱼藻对硝氮的转化能力也较强。

2.4 不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻可溶性蛋白含量的变化

在不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻可溶性蛋白含量的变化如图 4 所示,随着环境铵氮浓度的升高,金鱼藻可溶性蛋白含量先升高,后降低并到达平台期。植物体内的铵氮可在谷氨酰胺合成酶的催化下生

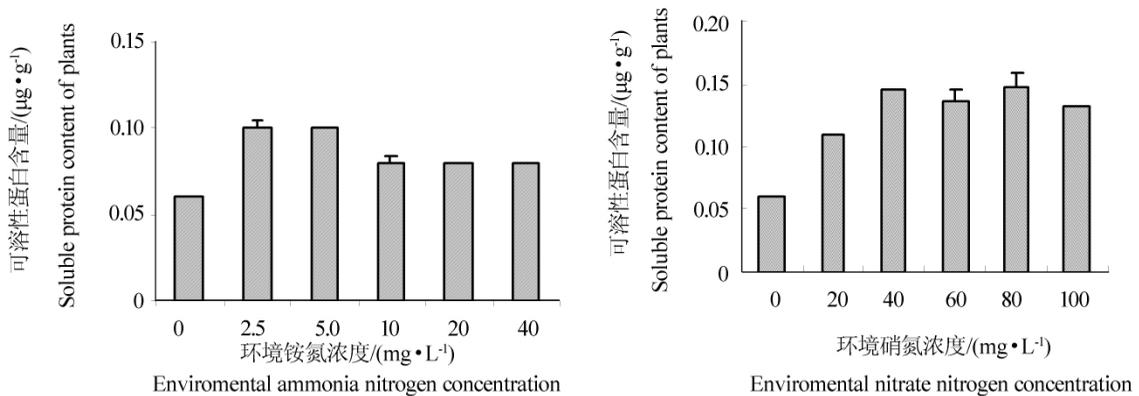


图 4 不同铵氮和硝氮浓度下金鱼藻可溶性蛋白含量

Fig. 4 Soluble protein content of *Ceratophyllum demersum* under different ammonia nitrogen and nitrate nitrogen concentration

成谷氨酰胺,最终合成蛋白质。因此植物体内的可溶性蛋白含量可在一定程度上反映植物对氮素的转化能力。在低浓度的铵氮(2.5 ~ 5 mg/L)环境中可溶性蛋白的含量相对较高,而此浓度下金鱼藻体内硝氮和铵氮的浓度较低,说明此浓度下金鱼藻对环境氮素的转化能力较强。在较高浓度的铵氮环境中(20 mg/L, 40 mg/L),随铵氮浓度增加,可溶性蛋白含量基本不变,而此浓度下金鱼藻体内铵氮含量较高,说明金鱼藻吸收铵氮的能力较强但是转化铵氮的能力较弱,吸收的铵氮最终没有合成蛋白质。

随着环境硝氮浓度的升高,金鱼藻可溶性蛋白含量先升高并到达平台期,当环境硝氮浓度大于 40 mg/L 时,随着浓度的增加可溶性蛋白含量基本不变。

3 结论与讨论

金鱼藻在 0 ~ 40 mg/L 的铵氮环境中生长,外观无明显差异。金鱼藻在低浓度的铵氮环境(0, 2.5, 5 mg/L)中,植物体内的硝氮和铵氮含量都较低,但可溶性蛋白含量相对较高,说明此浓度下金鱼藻对环境铵氮的转化能力较强。在较高浓度的铵氮环境中(20 mg/L, 40 mg/L),金鱼藻体内硝氮含量较低,铵氮含量较高,随环境铵氮浓度的增加可溶性蛋白含量基本不变,说明金鱼藻吸收铵氮的能力较强但是

转化铵氮的能力较弱,吸收的铵氮最终没有合成蛋白质。当环境中铵氮浓度提高到 60 mg/L 耐受 20 d,金鱼藻叶片全部变黄,当环境中铵氮浓度提高到 80 mg/L 耐受 20 d,金鱼藻叶片全部腐烂。所以这两个浓度条件下本研究没有植物材料测定相关指标,也说明金鱼藻对环境铵氮非常敏感,60~80 mg/L 的铵氮会对金鱼藻造成毒害。

金鱼藻在 0~100 mg/L 的硝氮环境中生长,外观无明显差异。当环境中硝氮浓度为 20~60 mg/L 时,金鱼藻的硝氮和铵氮含量都很高,可溶性蛋白含量也相对较高,说明此浓度范围内金鱼藻不仅对环境硝氮的吸收能力较强,而且对硝氮和铵氮的转化能力也较强,当环境中硝氮浓度为 80~100 mg/L 时,金鱼藻的硝氮和铵氮含量相对较低,但可溶性蛋白含量较高,说明此浓度范围内金鱼藻的转化能力较强。以上结果说明,在一定浓度范围内提高环境硝氮的浓度,可增加金鱼藻对硝氮的吸收和转化能力,可溶性蛋白含量达到一定水平后不再随环境硝氮浓度增加而增加。

综合以上实验结果,金鱼藻对硝氮的耐受能力更强,能在较高浓度的硝氮环境中生长,在一定浓度范围内提高环境硝氮的浓度,可增加金鱼藻对硝氮的吸收和转化能力,金鱼藻对铵氮较为敏感,环境中高浓度的铵氮对植物铵氮的转化具有一定的抑制作用,该实验结果与赵越等^[16]研究结果具有一致性。

参考文献:

- [1] 王俊,顾宇飞,朱增银,等. 不同营养状态下金鱼藻的生理响应[J]. 应用生态学报, 2005, 16(2): 337-340.
- [2] 刘颖,李虹,袁平成,等. 生活污水处理场主要湿地植物吸氮纳磷的生态功能[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(6): 1291-1296.
- [3] 王丹,张银龙,庞博. 金鱼藻对不同程度污染水体的水质净化效果[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2010, 34(4): 83-86.
- [4] 高镜清,黄五星,黄宇,等. 铵态氮胁迫下金鱼藻的过氧化损伤和抗氧化能力[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2010, 56(5): 590-596.
- [5] 樊英鑫,何开跃,袁丁,等. 尿素态氮对金鱼藻生长与生理特性的影响[J]. 河北北方学院学报: 自然科学版, 2010, 56(5): 590-596.
- [6] 袁峻峰,章宗涉. 金鱼藻对藻类的生化干预作用[J]. 生态学报, 1993, 13(1): 45-50.
- [7] 杨佼,刘慧芳,周耀华,等. 剑湖湿地入湖河流廊道及湖滨带对城镇生活污水净化效果的研究[J]. 河北农业科学, 2009, 13(10): 96-98.
- [8] 景丽洁,袁东海,王晓栋,等. 水生植物总氮测定中两种消化方法的比较[J]. 环境污染与防治, 2005, 27(5): 392-394.
- [9] 彭建平,曾淦宁,周燕,等. 海藻总氮含量测定方法研究[J]. 海洋环境科学, 2009, 28(spp1): 72-75.
- [10] 王朝辉,宗志强,李生秀,等. 蔬菜的硝态氮累积及菜地土壤的硝态氮残留[J]. 环境科学, 2002, 23(3): 79-83.
- [11] 余进祥,赵小敏,吕啡,等. 鄱阳湖流域不同农业利用方式下的氮磷输出特征[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(2): 394-402.
- [12] 闫修花,王桂珍,陈迪军. 纳氏试剂比色法直接测定海水中的铵氮[J]. 中国环境监测, 2003, 19(6): 8-10.
- [13] 蒋立科,罗曼. 生物化学实验设计与实践[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 246-247.
- [14] Yanagisawa S, Akiyama A, Kisaka H, et al. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions[J]. PNAS, 2004, 101(20): 7833-7838.
- [15] 张玉先,祁倩倩,罗奥,等. 锰对大豆氮代谢相关指标及产量品质的影响[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(4): 486-491.
- [16] 赵越,魏自民,马凤鸣. 不同水平铵态氮对甜菜硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶活力的影响[J]. 中国糖料, 2003(1): 23-25.