

文章编号:1000-0615(2007)01-0090-07

光照和不同形态氮营养盐供应对坛紫菜硝酸还原酶活性的影响

徐智广¹, 邹定辉¹, 张鑫¹, 刘树霞¹, 高坤山^{1,2}

(1. 汕头大学海洋生物研究所, 广东 汕头 515063;

2. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要:为了探讨光照、 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 对坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 硝酸还原酶活性 (NRA) 的影响, 在光照和黑暗条件下分别对坛紫菜叶状体进行氮 (N) 饥饿→氮 (N) 加富和 N 加富→N 饥饿处理, 并测定 NRA 的变化。结果表明: 在 N 饥饿→N 加富过程中, 光照下 NRA 比黑暗中要高; NO_3^- -N 的加富能提高 NRA, 且在光照下比黑暗中 NRA 达到最大值的时间要短; 而 NH_4^+ -N 与 NO_3^- -N 共同对 N 饥饿藻体加富时 NRA 没有明显变化, 并与 NH_4^+ -N 单独加富无显著差异。另外, 对于 N 加富→N 饥饿的处理, 在光照下 NO_3^- -N 加富和 NH_4^+ -N 与 NO_3^- -N 共同加富的 NR 都能在 N 饥饿处理后的一段时间内维持较高的活性。这些结果说明: 光照和硝酸盐对 NRA 起正调节作用, 而铵盐对 NRA 起负调节作用, 但 NRA 与体外硝酸盐浓度并不成直接的正相关关系。

关键词:坛紫菜; 硝酸还原酶活性; 氮饥饿; 氮加富; 光照; 营养盐

中图分类号:S 917

文献标识码:A

Effect of light and different forms of nitrogen on the activity of nitrate reductase of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta)

XU Zhi-guang¹, ZOU Ding-hui¹, ZHANG Xin¹, LIU Shu-xia¹, GAO Kun-shan^{1,2}

(1. Marine Biology Institute, Shantou University, Shantou 515063, China;

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430072, China)

Abstract: To investigate the effects of light, nitrate (NO_3^- -N) and ammonium (NH_4^+ -N) on the activity of nitrate reductase (NRA) in the red alga *Porphyra haitanensis*, thalli were incubated in seawater with different N supply (N-enrichment and N-starvation) in the light or in darkness. The results showed that NRA was higher in the light than in darkness; NRA increased when thalli were incubated in NO_3^- -N, and it enhanced faster in the light than in darkness. There was no significant difference of NRA between thalli incubated in seawater enriched by NO_3^- -N and NH_4^+ -N simultaneously and those enriched by NH_4^+ -N solely. Additionally, NR in light could maintain relative high activity for several hours when thalli were transferred from N-enrichment to N-starvation. It was concluded that light and / or NO_3^- -N increased NRA of *Porphyra haitanensis*, but NH_4^+ -N restrained it. However, NRA was not in direct proportion to the concentration of NO_3^- -N in culture.

收稿日期: 2006-05-29

项目资助: 国家自然科学基金项目 (30670396 和 30470343); 广东省自然科学基金项目 (04010990); 广东省科技计划项目 (2006B20601005)

作者简介: 徐智广 (1977-), 男, 河北唐山人, 硕士研究生, 主要从事海洋环境和海藻生物学的研究

通讯作者: 邹定辉, E-mail: dhzhou@stu.edu.cn

Key words: *Porphyra haitanensis*; activity of nitrate reductase; N-starvation; N-enrichment; light; nutrient

近些年陆源污染物对海洋的污染日益加重,同时由于海水养殖业的迅猛发展,近海富营养化现象日趋严重^[1]。由于海水中营养盐元素的化合价具有多态性,因而造成了水体富营养化形式与过程的多样化;另一方面,由于营养物质的来源复杂,且营养盐因子还受到季节变换、生物作用及温度、盐度等理化因子的影响,海水营养盐在一定时空范围内表现出动态分布特征^[2],从而增加了海水富营养化治理的难度。目前,国内外学者普遍认为养殖大型海藻是吸收、利用营养物质,延缓并改善水域富营养化的有效措施之一^[3-5]。

海水中的营养盐主要指无机态的氮(N)、磷(P)和硅(Si),而N是限制海藻生长的主要营养元素。在海洋生态系统中,硝酸根(NO_3^-)是N的主要形式,而它必须被还原成铵根(NH_4^+)才能参与海洋植物的N代谢过程。由 NO_3^- 还原到 NH_4^+ 的反应分为两步:第一步是 NO_3^- 还原成 NO_2^- ,此步反应由硝酸还原酶(NR)催化;第二步是 NO_2^- 还原成 NH_4^+ ,由亚硝酸还原酶(NiR)催化。其中,第一步反应是整个过程的限速反应,而NR是整个过程的限速酶^[6]。因此研究NR的活性对于海藻N代谢的研究具有重要意义^[7]。

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是中国南方海域海水养殖的主要大型经济海藻,近年来,由于其在食品、纺织、医药等行业的广泛应用,以及人工养殖技术问题的解决,坛紫菜的养殖面积和规模越来越大。除了经济上的效益,坛紫菜的大规模养殖也是降低中国南方近海富营养化的一条有效途径^[8]。很多学者对坛紫菜的生理生化及分子方面展开了比较深入的研究^[9-12]。但是,目前对于坛紫菜营养代谢与富营养环境关系的研究报道还很少见。本文对坛紫菜NRA与光照、N供应状况之间的关系进行了研究,以探讨光照及不同形式营养盐浓度的剧烈变化对坛紫菜NRA的影响,进而为坛紫菜缓解富营养化作用提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

坛紫菜(叶状体阶段)采自广东省汕头市南澳岛近海筏式吊养区。采集时选择健康一致的叶

状体,长度15 cm左右,放于盛有少量海水的塑料袋中,用低温箱(温度4℃左右)在3 h内运到实验室。然后选用藻体同一部位(因为藻体不同部位NRA可能不同^[13],本研究选用叶状体中部),剪成1.5 cm×1.5 cm的小块,在高压灭菌的自然海水(pH:8.2;盐度:33; NO_3^- -N浓度: $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; NH_4^+ -N浓度: $0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)中培养24 h(培养条件为:温度15℃;光照强度 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;光暗比为12 h:12 h;用充气泵24 h充空气),使藻体受伤组织愈合、恢复活性,然后用作实验材料。实验在4 d内进行,超过4 d则丢掉剩余藻体,重新采用新鲜的材料。

1.2 培养水体的配制

人工海水的配制 参照Larsson等^[14]的方法,在蒸馏水中加入NaCl $450 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MgSO_4 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaHCO_3 $2.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,配成溶液。

N缺乏的F/2加富培养基的配制 参照Borowitzka^[15]的方法,其中不加入 NaNO_3 ,使培养水体中不缺乏其他营养元素而保证N浓度为零。

各种处理培养水体的配制

(1)N饥饿处理:人工海水+N缺乏的F/2加富培养基;

(2)N加富处理:最终N浓度都保持为 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;

① 氨氮(NH_4^+)加富:人工海水+N缺乏的F/2加富培养基+ NH_4Cl ;

② 氨氮和硝氮($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$)共同加富:人工海水+N缺乏的F/2加富培养基+ NH_4Cl 和 NaNO_3 (二者摩尔浓度比为1:1);

③ 硝氮(NO_3^-)加富:人工海水+N缺乏的F/2加富培养基+ NaNO_3 。

1.3 自然海水中坛紫菜NRA的日变化

实验室培养24 h后的藻体,放入新鲜的高压灭菌的自然海水中培养(培养条件为:温度15℃;光照强度 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;光暗比为12 h:12 h;培养密度1 L水体放1.0 g湿重藻体;每天24 h充空气),24 h(一昼夜)内每隔3 h取样测定NRA。

1.4 对藻体处理后 NRA 的变化

N 饥饿→N 加富处理时光照(或黑暗)条件下 NRA 的变化 实验室培养 24 h 后的藻体,放入 N 饥饿条件下培养 48 h(培养条件同 1.3),然后转入 3 种 N 加富处理的水体中(其他培养条件不变),从光照(或黑暗)的 0 时刻到第 3 小时,每隔 1 h 分别取样测其 NRA,第 3 到第 12 小时每隔 3 h 分别取样测其 NRA。

N 加富→N 饥饿处理时光照(或黑暗)条件下 NRA 的变化 实验室培养 24 h 后的藻体,分别放入 3 种 N 加富水体中培养 48 h(培养条件同 1.3),然后分别转入 N 饥饿处理中(其他培养条件不变),从光照(或黑暗)的 0 时刻到第 3 小时,每隔 1 h 分别取样测其 NRA,第 3 到第 12 小时每隔 3 h 分别取样测其 NRA。

连续光照(或连续黑暗)条件下 N 饥饿与 N 加富交替处理时 NRA 的变化 实验室培养 24 h 后的藻体,放入 N 饥饿条件下培养 6 h,分别转入 3 种 N 加富水体中培养 6 h,然后再转入 N 饥饿条件下培养 6 h(培养条件同 1.3)。全程每隔 2 h 分别取样测定 NRA,在每次处理开始的 2 h 内每隔 1 h 测定一次。整个处理过程为连续光照(或连续黑暗)。

1.5 硝酸还原酶活性(NRA)的测定

参照 Corzo 等^[16]的方法,通过测定一定量藻体(活体)在一定量反应介质中单位时间内产生的亚硝氮(NO_2^- -N)的量来表示藻体的 NRA。具体方法为:称取 0.1 g 藻体(鲜重)→加入 10 mL 反应介质缓冲液(0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液,pH:7.5;0.01 mmol·L⁻¹的葡萄糖;0.5 mmol·L⁻¹的 Na-EDTA;200 mmol·L⁻¹的 NaNO_3)→充氮气 2 min(赶出溶液中的氧气)→黑暗条件下 30 °C 反应 30 min→取出藻体→吸取反应介质缓冲液 2 mL 加入 1 mL 磺胺试剂,5 min 后加入 1 mL 盐酸萘乙二氨试剂,混匀,静置 15 min→测定 543 nm 处的吸光值→用标准曲线回归方程计算亚硝氮(NO_2^- -N)的含量,然后计算酶活性。以每克鲜重藻体每 h 产生的 NO_2^- -N 量表示 NRA(单位为: $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)。标准曲线用不同浓度的 NaNO_2 标准溶液制作。

1.6 统计分析

所有测定结果表示为平均数±标准差($n\geq 3$),用方差分析(ANOVA)和 t -检验进行统计显著性分析,以 $P < 0.05$ 作为差异的显著性水平。

2 结果

2.1 硝酸还原酶日变化

自然海水中,在温度 15 °C、光照强度 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光暗比为 12h:12h 条件下,坛紫菜的 NRA 从光照周期开始时逐渐升高,至第 6 小时达到最高值 [$(1.045 \pm 0.304) \mu\text{mol}\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$],以后又逐渐降低,光照结束以后其值没有明显的变化,维持在 $0.6 \mu\text{mol}\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 左右(图 1)。

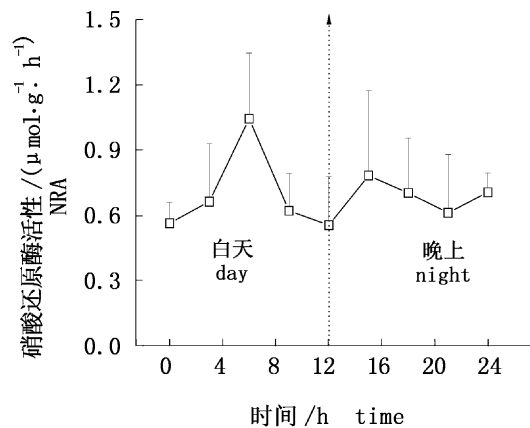


图 1 自然海水中 NRA 的日变动
Fig.1 Daily changes of NRA in the *Porphyra haitanensis* thalli incubated in natural seawater

2.2 N 饥饿→N 加富处理时 NRA 的变化

在光照条件下(图 2-A), NH_4^+ 加富和 $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ 共同加富两种处理的 NRA 在整个处理的 12 h 内都没有明显的变化,一直保持较低的值,在 0.05 至 $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 之间。而 NO_3^- 加富处理的 NRA 先增大,2 h 后达到最大值,为 $(1.321 \pm 0.250) \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,然后又降低,在第 3 小时降低到 $(0.748 \pm 0.055) \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,其后 NRA 维持在较稳定的水平。

在黑暗条件下(图 2-B), NH_4^+ 加富和 $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ 共同加富两种处理的 NRA 在整个处理的 12 h 内几乎都没有活性。 NO_3^- 加富处理的 NRA 在处理初期逐渐变大,6 h 后达到最大值 $(1.503 \pm 0.317) \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,以后逐渐降低至 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 左右后保持较稳定的水平。

2.3 N 加富→N 饥饿处理时 NRA 的变化

在光照条件下,3 种处理之间 NRA 的变化存在显著差异($P < 0.05$)。 NH_4^+ 加富处理的 NRA

始终保持很低的水平,在 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 以下; $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ 共同加富与 NO_3^- 加富处理的 NRA 初始值之间没有显著差异(约为 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),但随光照时间的延长, $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ 共同加富处理的 NRA 在 6 h 内都没有显著变化,6 h 以后开始降低直到与 NH_4^+ 加富处理的 NRA 相似;而 NO_3^- 加富处理的 NRA 经 1 h 就升高到 $(1.110 \pm 0.293) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,以后 5 h 内均维持在较高水平,6 h 后开始降低,直到 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (图 3-A)。

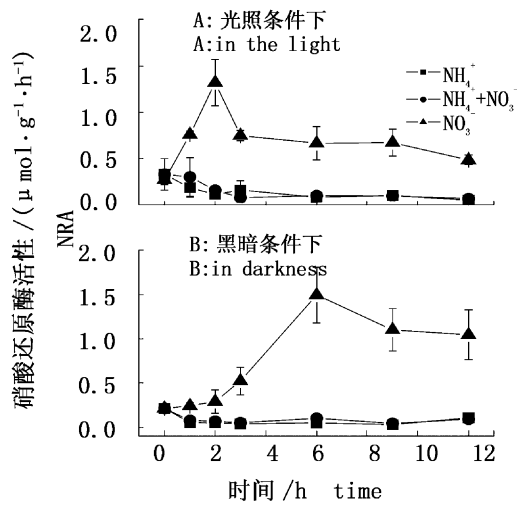


图2 N饥饿→N加富处理 NRA 的变化
Fig. 2 Time-course of changes for NRA in the N-depleted *Porphyra haitanensis* thalli when transferred to N-enriched seawater

黑暗条件下, NH_4^+ 加富和 $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ 共同加富两种处理的 NR 在整个处理的 12 h 内几乎都没有活性;而 NO_3^- 加富处理 NRA 先下降再升高,最后又下降,直到与另两种处理没有显著差异,但其最大值也只有光照下最大值的 26.8% (图 3-B)。

2.4 N 饥饿与 N 加富交替处理时 NRA 的变化

光照条件下,3 种情况在开始的 6 h 内经过同样的饥饿处理,NRA 出现升高→降低→升高→降低的变化趋势(如图 4-A)。在以后的处理中, NH_4^+ 加富和 $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ 共同加富两种处理的 NRA 不再升高,始终保持很低的值,在 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 左右; NO_3^- 加富的 NRA 在第 6~12 小时内有一定程度的升高,这种升高的趋势一直持续到 12~18 h 的饥饿处理结束以后。

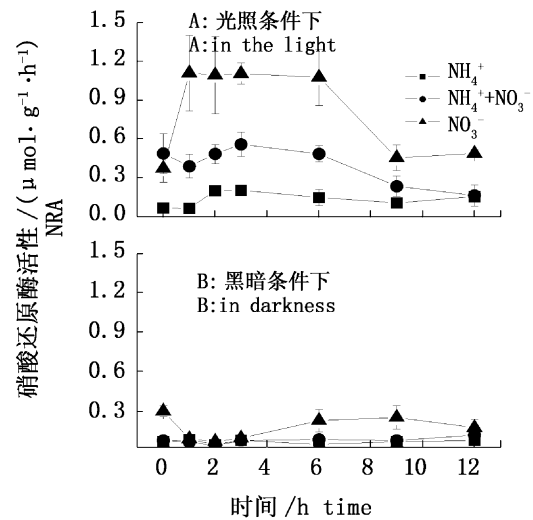


图3 N加富→N饥饿处理 NRA 的变化
Fig. 3 Time-course of changes for NRA in the N-repleted *Porphyra haitanensis* thalli when transferred to N-depleted seawater

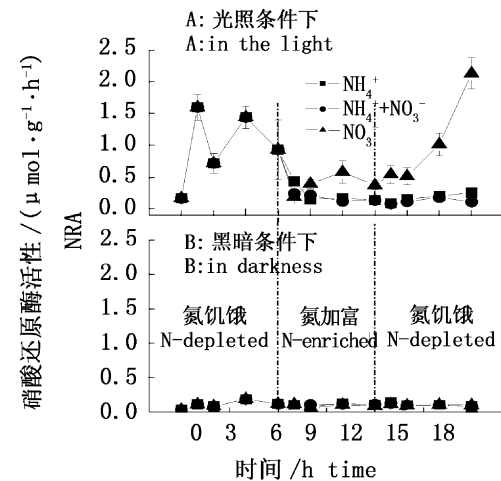


图4 N饥饿→N加富→N饥饿交替处理 NRA 的变化
Fig. 4 Time-course of changes for NRA in the N-depleted *Porphyra haitanensis* thalli when transferred to N-enriched seawater for 6 h, and then to N-depleted seawater for another 6 h

黑暗条件下,3 种处理的 NRA 整个过程都比较高,始终保持在 $0.2 \mu\text{mol} \text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 以下,且 3 种处理之间没有显著性差异(图 4-B)。

3 讨论

坛紫菜作为中国南方改善近海富营养化程度的推荐养殖品种,对于它的营养代谢等生理方面的研究急需加强^[8]。作为氮代谢过程的关键酶^[6],NR 的研究具有非常重要的意义。本研究结果表明,坛紫菜的 NRA 受到光照、底物

(NO_3^-)水平及 NH_4^+ 的调节。

3.1 光照调节

坛紫菜在自然海水中,温度 $15\text{ }^\circ\text{C}$ 、光照强度 $120\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光暗比为 $12\text{ h}:12\text{ h}$ 条件下,其 NRA 所呈现的日变化规律(图 1)与其他许多海藻 NRA 的规律相似:最高的 NRA 出现在光照的中间时刻,而黑暗阶段的活性都比较低^[6,17];对比图 2 中的 A、B,发现同是 NO_3^- 加富处理,在光照条件下 NRA 在 2 h 内就达到最高值,黑暗条件下则要 6 h;对比图 3 中的 A、B, NO_3^- 加富转到饥饿条件中,黑暗下 NRA 比光照下低的多;而图 4 中连续黑暗时,各种处理下 NRA 都很低。可见光照可以促进 NRA 的升高,其原因可能是由于 NO_3^- 还原过程所必需的 ATP(提供能量)、NADH(作为电子供体)和中间产物均来自于光合作用。其它一些研究也表明光照对 NRA 有促进作用,例如:Chow 等^[18]以智利江篱(*Gracilaria chilensis*)为材料,在连续黑暗阶段分别给予 10 min 和 60 min 的光照,结果发现 NRA 分别提高了 30% 和 45%,因而指出,智利江篱 NR 对于光非常敏感,短时间的光照就能够增大 NRA。但也有学者认为光照在调节 NRA 中的作用并不大,而生物钟调节则起着更大的调节作用。例如:Granbom 等^[19]对长心卡帕藻(*Kappaphycus alvarezii*)的研究结果表明,在连续光照下,当光强为 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,NRA 在 24~48 h 内出现了自然日变化那样的摆动:生理节奏上的白天活性高而生理节奏的晚上低,最高活性出现在生理白天的第 4 小时。从而说明长心卡帕藻的 NR 活性受到生物钟的调节。本研究中坛紫菜从 N 饥饿、12:12(D:L)条件下转到黑暗中,同时加富 NO_3^- (图 2-B),结果 NRA 在 6 h 内上升到最大值(本处理的 0~12 h 相当于生理节奏上的白天),其摆动规律类似于自然条件下的日变动,说明坛紫菜 NR 也受到生物钟的调节,其 NR 表达所需的 ATP、NADH 等可能是来自黑暗处理之前的光合作用产物在细胞内的积累。因此,本研究表明,坛紫菜 NRA 既受到光照的促进,同时也受到生物钟的调节。至于光照和生物钟调节在 NR 表达中如何协调的起作用,尚需进一步研究。

3.2 底物调节

对高等植物、真菌类和海藻类一些种类的有

关研究表明,NR 是一种底物诱导酶,底物 NO_3^- 的存在或其浓度的升高可以诱导 NR 的产生,从而使其活性升高^[20]。Amy 等^[21]把培养在 NH_4^+ -N 为唯一 N 源中的假脚海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)转入到 NO_3^- -N 浓度为 $18\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 F/2 培养基中,NRA 迅速升高,从而推测底物 NO_3^- 对 NR 的表达起着诱导作用。本研究以大型海藻坛紫菜为材料,对其进行 N 饥饿→N 加富的处理(图 2),结果表明 NO_3^- 的从无到有刺激产生了 NRA,说明底物 NO_3^- 对坛紫菜 NR 存在相似的诱导作用,只是诱导时间比假脚海链藻要长,这可能是由于海藻种类不同所致。另外,本研究中坛紫菜 NRA 并不与培养水体中的 NO_3^- 浓度成直接的正相关关系,从图 3-A 和图 4-A 可以看到:当材料从 N 加富转到 N 饥饿培养水体中时,NRA 仍能在一段时间内维持较高的水平,这可能是因为在坛紫菜细胞中存在着 N 库,当培养水体中的 NO_3^- 浓度比较大时,细胞吸收 NO_3^- 的速度可能会超过 NR 对 NO_3^- 的还原速度,于是 NO_3^- 就在液泡中暂时储存,当水体中 NO_3^- 缺乏时,N 库中积累的 NO_3^- 再次释放到细胞质中,以满足 N 代谢的需要。对于海藻的 N 库,已经有了一些研究报道:Dortch 等^[22]在中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)中发现,在外界 NO_3^- 耗尽的过程中或耗尽后,胞内储备 NO_3^- 的利用使藻类在外界极低的 NO_3^- 水平下仍维持很高的 NRA。本研究中,当坛紫菜转到 N 饥饿条件时仍能保持高的 NRA,这与 Dortch 等的研究结果十分相似。许多大型海藻都能储存 N,基于这一特点,海藻可能更易适应在营养不足状态下的持续快速生长。正因为这种营养库的储存能力,使 NRA 不仅被外界 NO_3^- 浓度所调节,同时也被自身 N 库的大小所调节,并且导致 NRA 与外界 NO_3^- 浓度相关性较差,而与胞内 NO_3^- 浓度的增加成正相关关系^[23]。所以,笔者推测坛紫菜 NRA 可能与细胞内 NO_3^- 浓度的相关性更好一些,而 N 库在调节胞内 NO_3^- 浓度中有着一定的作用,但直接证据还需进一步研究。

3.3 NH_4^+ 调节

本文结果表明,与底物 NO_3^- 和光照可以促进坛紫菜 NRA 的作用相反, NH_4^+ 对 NRA 起着负调控的作用。关于 NH_4^+ 对 NRA 的抑制作用,

以前的研究也有过报道。例如: Amy 等^[21]把培养在 NO_3^- -N 中的假脚海链藻转入到 NH_4^+ -N 为唯一 N 源的 F/2 培养基中,或者把 NH_4^+ -N 加入到培养藻体的 NO_3^- -N F/2 培养基中, NRA 都迅速下降。本研究中,当 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 共同加富时(图 2),其 NRA 与单独用 NH_4^+ -N 加富处理的没有显著差异,都很低,这与 Amy 等的研究结果相似。不过, NH_4^+ 的这种抑制作用并不是永久性的。Cannons 等^[24]在藻类研究中发现,当抑制因子消除后, NR 基因又得以表达。本研究中在去掉抑制因子 NH_4^+ 后,在光照和 NO_3^- -N 库提供 NO_3^- 的条件下, NR 仍能够再次表达(图 3-A),说明 NH_4^+ 对 NRA 的抑制作用是可调节的,当去除抑制条件时, NR 仍能够继续合成而恢复活性,这与 Cannons 等的结论相似。

参考文献:

- [1] Naylor R L. Nature's subsidies to shrimp and salmon farming [J]. *Science*, 1998, 282: 883 - 884.
- [2] 暨卫东. 厦门马銮湾有机污染、富营养化状况下的生化关系[J]. *海洋学报*, 1998, 20(1): 134 - 143.
- [3] 董双林, 李德尚, 潘克厚, 等. 论海水养殖的养殖容量[J]. *青岛海洋大学学报*, 1998, 28(2): 245 - 250.
- [4] 林秋奇, 王朝晖, 杞桑, 等. 水网藻 (*Hydrodictyon reticulatum*) 治理水体富营养化的可行性研究[J]. *生态学报*, 2001, 21(5): 814 - 819.
- [5] 况琪军, 马沛明, 刘国祥, 等. 大型丝状绿藻对 N、P 去除效果研究[J]. *水生生物学报*, 2004, 28(3): 323 - 326.
- [6] Lopes P F, Oliveira M C, Colepicolo P. Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) [J]. *Phycologia*, 1997, 33: 225 - 231.
- [7] Zou D H. Effects of elevated atmospheric CO_2 on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in the economic brown seaweed, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyta) [J]. *Aquaculture*, 2005, 250: 726 - 735.
- [8] Fei X G. Solving the costal eutrophication problem by large scale seaweed cultivation [J]. *Hydrobiologia*, 2004, 512: 145 - 151.
- [9] 邹定辉, 高坤山. 坛紫菜光合作用对重碳酸盐的利用[J]. *科学通报*, 2002, 47(12): 926 - 930.
- [10] 庞国兴, 王广策, 胡松年, 等. 坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 丝状孢子体 EST 的获取及其生物信息学分析[J]. *海洋与湖沼*, 2005, 36(5): 452 - 458.
- [11] Zou D H, Gao K S. Effects of desiccation and CO_2 concentrations on emerged photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta), a species farms in China [J]. *Eur J Phycol*, 2002, 37: 587 - 592.
- [12] Zou D H, Gao K S. Exogenous carbon acquisition of photosynthesis in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) under emerged state [J]. *Prog Nat Sci*, 2004, 14(2): 138 - 144.
- [13] Hurd C L, Berges J A, Osborne J, et al. An *in vitro* nitrate reductase assay for marine macroalgae: optimization and characterization of the enzyme for *Fucus gardneri* (Phaeophyta) [J]. *Phycologia*, 1995, 31: 835 - 843.
- [14] Larsson C, Axelsson L, Ryberg H, et al. Photosynthetic carbon utilization by *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) from a Swedish rockpool [J]. *Eur J Phycol*, 1997, 32: 49 - 54.
- [15] Borowitzka M A. Micro algal biotechnology [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1988: 457 - 465.
- [16] Corzo A, Niell F X. Determination of nitrate reductase activity in *Ulva rigida* C. Agardh by the *in situ* method [J]. *Exp Mar Biol Ecol*, 1991, 146: 181 - 191.
- [17] Gao Y, Smith G J, Alberte R S. Light regulation of nitrate reductase in *Ulva fenestrata* (Chlorophyceae). Part I. Influence of light regimes on nitrate reductase activity [J]. *Mar Biol*, 1992, 112: 691 - 696.
- [18] Chow F, Oliveira M C, Pedersen M. *In vitro* assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis* [J]. *J Plant Physiol*, 2004, 161: 769 - 776.
- [19] Granbom M, Chow F, Lopes P F, et al. Characterisation of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) [J]. *Aqua Bot*, 2004, 78: 295 - 305.
- [20] Crawford N M, Arst N H J. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants [J]. *Annu Rev Genet*, 1993, 27: 115 - 146.
- [21] Amy N K, Carrett R H. Purification and

- characterization of the nitrate reductase from the diatom *Thalassiosira pseudonana* [J]. *Plant Physiol*, 1974, 54: 629 – 637.
- [22] Dortch Q, Ahined S I, Packard T T. Nitrate reductase and glutamate dehydrogenase activities in *Skeletonema costatum* as measures of nitrogen assimilation rates [J]. *Plankton Res*, 1979, 1: 169 – 181.
- [23] Collos Y, Slawyk G. Significance of cellular nitrate content in natural population of marine phytoplankton board cultures [J]. *Mar Biol*, 1976, 34: 27 – 32.
- [24] Cannons A C, Pendleton L C. Possible role for mRNA stability in the ammonium-controlled regulation of nitrate reductase expression [J]. *J Biochem*, 1994, 297: 561 – 565.

文后参考文献著录格式示例

(1) 专著

- [1] 李家泰. 临床药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 80 – 90.
- [2] International Federation of Library Association and Institutions. Names of persons: national usages for entry in catalogues [M]. 3 rd ed. London: IFLA International Office for UBC, 1997.

(2) 期刊

- 田永胜, 陈松林, 刘本伟, 等. 大西洋牙鲆冷冻精子 × 褐牙鲆卵杂交胚胎的发育及胚后发育 [J]. *水产学报*, 2006, 30(4): 433 – 443.

(3) 论文集

- 辛希孟. 信息技术与信息服务国际研讨会论文集: A 集 [C]. 北京: 中国社会科学出版社, 1994.

(4) 学位论文

- 梁志强. 坛紫菜遗传育种的初步研究 [D]. 上海: 上海水产大学硕士学位论文, 2004.

(5) 科技报告

- 冯西桥. 核反应堆压力管道与压力容器的 LBB 分析 [R]. 北京: 清华大学核能技术设计研究院, 1997.

(6) 电子文献

- [1] Christine M. Plant physiology: plant biology in the Genome Era [J/OL]. *Science*, 1998, 281: 331 – 332 [1998 – 09 – 23]. <http://www.sciencemag.org/cgi/collection/anatmorp>.
- [2] Turcotte D L. Fractals and chaos in geology and geophysics [M/OL]. New York: Cambridge University Press, 1992 [1998 – 09 – 23]. <http://www.seg.org/reviews/mccorm30.html>.