

硝化抑制剂双氰胺对葛仙米的生物毒性

邵继海,冯丹怡,冯烨,金文熙,谭雅琪

(湖南农业大学 环境与生态学院,长沙 410128)

摘要:为了准确地评估硝化抑制剂双氰胺(DCD)对固氮蓝藻的生物毒性,为农田合理应用硝化抑制剂和固氮蓝藻提供理论依据,选取稻田可食用固氮蓝藻—拟球状念珠藻(*Nostoc Sphaeroides*, 俗名葛仙米),从生长、光合系统、固氮活性和氧化—抗氧化系统等方面,研究了田面水培养条件下 DCD 对葛仙米的生物毒性.结果表明,田面水中 DCD 质量浓度为 $240\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,显著抑制葛仙米的生长.DCD 胁迫能降低葛仙米藻蓝蛋白(PC)含量,损伤光合系统 II,诱导细胞内活性氧(ROS)含量升高.葛仙米胞内抗氧化防御系统可以消除低质量浓度 DCD 引起的氧化胁迫,当 DCD 质量浓度达到 $300\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,藻细胞受到氧化性损伤.低质量浓度的 DCD 可增强葛仙米的固氮活性,但是当其质量浓度 $\geq 240\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,显著抑制该藻的固氮活性.研究结果表明,培育葛仙米的稻田,田面水中 DCD 质量浓度建议不超过 $120\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

关键词: 生长率;光合系统;氧化—抗氧化系统;固氮酶活性

中图分类号: Q89

文献标志码: A

文章编号: 1000-2367(2026)04-0001-08

氮素是植物生长必需的主要营养元素之一,氮肥的施加可以提高作物的产量^[1].但如果施加过量的氮肥,不仅对作物的增产效应甚微,还会降低作物对氮肥的利用效率,导致农田中大量氮肥流失^[2].目前使用的化学氮肥主要是尿素和碳酸氢铵.没有被作物吸收的铵态氮或尿素分解生成的铵态氮会被土壤中的硝化细菌和硝化古菌氧化为硝态氮^[3].而铵态氮转化为硝态氮的过程中,会释放出氢离子导致土壤酸化;此外,在转化过程中也会产生温室气体氧化亚氮.相较于铵态氮,土壤中的硝态氮更易流失,并最终导致水体富营养化^[4].双氰胺(DCD)是一种常用的硝化抑制剂,该物质通过抑制氨氧化细菌和氨氧化古菌的氨单加氧酶(AMO)和羟胺氧化酶(HAO),进而抑制农田土壤中氨态氮的硝化过程^[5].

固氮蓝藻是农田中重要的微生物类群.这类微生物可以通过生物固氮作用向稻田输入氮素.据统计,接种固氮蓝藻能减少稻田 50% 左右的化学氮肥使用量,还能增加水稻产量^[6].除了生物固氮功能外,稻田固氮蓝藻还可以通过提高氮素利用效率、减少稻田中氮挥发的方式减少稻田氮素流失^[7].作为光能自养微生物,固氮蓝藻还能通过光合作用同化稻田 CO_2 ,减少稻田中 CO_2 的排放,增加稻田土壤有机质含量^[8].农田固氮蓝藻的研究已有近百年的历史,然而到目前为止,鲜见其生产应用.固氮蓝藻生长缓慢,菌肥生产成本高是抑制其产业化发展和应用的瓶颈.拟球状念珠藻(*Nostoc Sphaeroides*, 俗名葛仙米)是一种生长在稻田的可食用固氮蓝藻.作为一种生物氮肥,葛仙米能增加稻田土壤氮含量,并可以促进水稻的生长.同时葛仙米具有较高的保健和药用价值^[9],稻田收获葛仙米带来的经济效益有望克服固氮蓝藻菌肥生产成本低难以产业化的缺点.

通过固氮微生物来削减稻田化学氮肥使用量和利用硝化抑制剂减少稻田铵态氮的硝化反应,均是提高氮肥利用效率,减少稻田氮素流失和减缓农田土壤酸化的重要举措.然而,当硝化抑制剂和固氮蓝藻同时使用

收稿日期: 2024-11-29; **修回日期:** 2025-01-08.

基金项目: 国家自然科学基金(32071647).

作者简介(通信作者): 邵继海(1979—),男,湖北洪湖人,湖南农业大学教授,博士生导师,研究方向为蓝藻生理生态, E-mail: shao@hunau.net.

引用本文: 邵继海,冯丹怡,冯烨,等.硝化抑制剂双氰胺对葛仙米的生物毒性[J].河南师范大学学报(自然科学版),2026, 54(4):1-8.(Shao Jihai, Feng Danyi, Feng Ye, et al. Bio-toxicity of nitrification inhibitor dicyandiamide on *Nostoc sphaeroides*[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2026, 54(4):1-8. DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2024.11.29.0001.)

时,硝化抑制剂可能对固氮蓝藻产生毒性,抑制其生态功能的发挥.有研究表明,在微藻培养基 BG11 培养条件下,100 mg · L⁻¹ DCD 对类珠藻(*Aliinostoc* sp.)生长具有抑制作用^[10].不同微藻对同一环境胁迫的响应可能具有很大的差异,Gauthier 等^[11]研究显示,在相同的铝胁迫下,宽松鱼腥藻(*Anabaena laxa*)相较于灰色念珠藻(*Nostoc muscorum*)体内抗氧化系统防御能力更强,铝胁迫导致的氧化性损伤更小.微藻对环境胁迫的响应也受环境条件的影响.例如,Liao 等^[12]的研究指出,在氮缺乏或者磷缺乏的环境中,铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)对 PFOS 的摄取量较之在营养充足的环境中有显著的增加,受到 PFOS 损伤也更强.稻田田面水的化学成分与微藻的培养基有较大的差别,尽管最近有研究探讨了 BG11 培养基培养条件下,DCD 对类珠藻的生物毒性,然而,在稻田环境中,DCD 对固氮蓝藻的生物毒性尚不清楚.此外,葛仙米在稻田会形成球状群体,其对 DCD 胁迫的生理响应也必然不同于呈分散丝状的固氮蓝藻.

为了真实反映稻田环境条件下 DCD 对葛仙米的毒性,本文以田面水为介质,研究了 DCD 对葛仙米生长、光合作用、固氮活性和氧化—抗氧化系统的影响,以期在稻田中合理使用硝化抑制剂和固氮蓝藻提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验选用的拟球状念珠藻(*Nostoc Sphaeroides*, 俗名葛仙米)分离自湖北鹤峰稻田.将球状的葛仙米颗粒经体积分数 75% 酒精表面消毒,并进一步碾磨、破碎后接种至 BG11 培养基中,光照振荡培养获得直径 ≤ 0.1 mm 的微粒状葛仙米待用.培养条件:光照强度 2 000 lx、光照与黑暗周期为 12 h:12 h、培养温度(25 ± 1) °C.

收集稻田土后经风干、研磨后过 20 目筛,按照 10 : 9(*m* : *m*)的比例与去离子水混合均匀.于 25 °C 黑暗环境下温育 15 d,实验全程保持淹水 1 cm 状态.温浴结束后,取上清液后过 0.22 μm 醋酸纤维滤膜,得到无菌的田面水.田面水理化性质如下:pH 6.62、TN(12.59 mg · L⁻¹)、NH₄⁺-N(0.322 mg · L⁻¹)、NO₃⁻-N(6.76 mg · L⁻¹)、TP(0.14 mg · L⁻¹)、有效磷 0.0617 mg · L⁻¹、COD(692.3 mg · L⁻¹).实验所使用的稻田土来源于湖南农业大学耘园基地(28°18'25" N, 113°07'34" E).

1.2 实验设置

毒理实验在田面水介质中进行.向 250 mL 锥形瓶中加入 91 mL 无菌田面水、3 mL 对数生长期的葛仙米微粒悬浮液、5 mL 柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液和 1 mL 不同质量浓度 DCD 母液.鉴于 DCD 在田间用量为土壤全氮含量 5%~10% 时产生最佳效果^[13].因而在设定 DCD 质量浓度时,我们参考了其在农田中的施用标准,将 DCD 的最大应用质量浓度定为不超过土壤全氮含量的 10%,最高质量浓度设定为 300 mg · L⁻¹.实验起始时,培养体系 pH 为 7.0,各组初始叶绿素 *a* (Chl *a*) 质量浓度设置为 0.55 mg · L⁻¹,DCD 质量浓度分别设置为 0(对照组)、120、240 和 300 mg · L⁻¹,其中对照组使用等量蒸馏水替代 DCD 溶液.柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液的终浓度为 40 mmol · L⁻¹.预实验结果表明,该质量浓度的缓冲液对葛仙米的生长和光合作用无显著影响,并能有效维持培养液 pH 稳定.每个处理组设置 3 个重复,光照条件与前述 1.1 节相同.在 DCD 胁迫 24 h 后,对葛仙米的各项生理指标进行取样测定.

1.3 光合色素含量及生长速率的测定

取样 4 mL,置于 4 °C, 8 500 r · min⁻¹ 条件下离心 5 min,去除上清液,用体积分数 95% 乙醇定容至 4 mL,保持在 4 °C 避光条件下浸提,同时为了确保提取过程的均匀性,不定时进行摇晃,24 h 后再次离心取上清液,测定其在 665、649、470 nm 处的吸光值.Chl *a* (mg/L) 和类胡萝卜素(carotenoids) (mg/L) 的计算公式如下.

$$\rho_{\text{Chl } a} = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649}, \quad (1)$$

$$\rho_{\text{carotenoid}} = \frac{1\,000 \times A_{470} - 2.05 \times \rho_{\text{Chl } a}}{245}. \quad (2)$$

由于葛仙米生长速率较低,且菌丝聚集呈球形,无法利用传统方法进行显微镜计数,于是选用 96 h 内单位时间 Chl *a* 的变化速率来表征 DCD 对葛仙米生长的影响.

1.4 粗酶液的提取及藻胆素含量的测定

取样 30 mL,在 4 ℃,8 500 r · min⁻¹条件下离心去除上清液后,采用液氮研磨法进行粗酶液的提取.利用考马斯亮蓝染色法测定酶液总蛋白的质量浓度.按照 Basheva 等^[14]所述方法计算其中的藻蓝蛋白(PC)(mg/L)和别藻蓝蛋白(APC)(mg/L)含量.藻细胞内藻胆蛋白含量用每毫克蛋白质所含藻胆蛋白含量进行标准化.

$$\rho_{PC} = \frac{A_{620} - 0.70 \times A_{650}}{7.38}, \tag{3}$$

$$\rho_{APC} = \frac{A_{650} - 0.19 \times A_{620}}{5.65}. \tag{4}$$

1.5 叶绿素光诱导荧光(OJIP)的测定

葛仙米叶绿素光诱导荧光瞬态上升动力学使用浮游植物叶绿素荧光分析仪(AquaPen-C 100)测定.取样 2 mL,暗适应 15 min 后测定葛仙米 OJIP 动力学曲线.参照 Lin 等^[15]所述方法,分析叶绿素光诱导荧光动力学主要参数,即光合系统Ⅱ最大光化学效率(φP_0)、捕获的激子将电子传递到电子传递链中超过初级质体醌(QA)的其他电子受体的概率(ψ_0)、用于电子传递的量子产额(φE_0)、热耗散量子比率(φD_0)、光合放氧复合体性能 $(1 - V_k/V_j)_r$ 以及光合系统Ⅱ综合效能(PI_{abs}).

1.6 氧化-抗氧化系统的测定

藻细胞的过氧化氢酶(catalase,CAT)活性采用钼酸铵分光光度法测定^[16].采用硫代巴比妥酸的方法测定藻细胞中的丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量^[16].藻细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)含量利用荧光探针一还原型二氯荧光素二乙酯染色法测定^[16].选用总超氧化物歧化酶测定试剂盒(南京建成)测定葛仙米藻细胞内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)的活性.

1.7 固氮活性的测定

葛仙米的固氮活性采用经典乙炔还原法测定^[16].将葛仙米在 BG110 培养基中氮饥饿 15 d 后按照 1.2 节的步骤布置实验,并从中取样 40 mL.样品在 4 ℃,8 500 r · min⁻¹下离心 5 min 后移除 35 mL 上清液,然后转入 120 mL 血清瓶中,抽出瓶中 10%的空气,并向其中注入等体积的乙炔,光照培养 24 h 后,用气相色谱仪(安捷伦 GC-7890)检测其中乙炔还原产物乙烯的含量.

1.8 数据分析

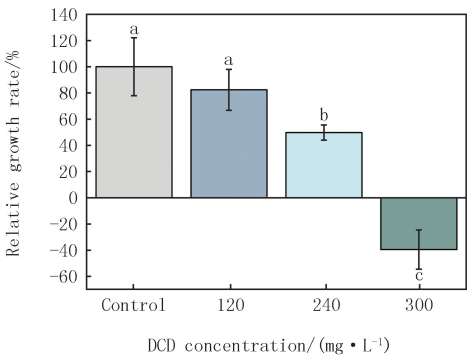
利用统计软件 SPSS 26 对实验数据进行单因素方差分析(ANOVA).数据以平均值±标准差来表示,其中 $p < 0.05$ 定义为具有显著差异.

2 结果与分析

2.1 DCD 对葛仙米生长和藻胆素含量的影响

图 1 显示在田面水培养条件下,不同质量浓度 DCD 处理对葛仙米生长速率的影响.质量浓度为 120 mg · L⁻¹的 DCD 对葛仙米的生长无显著影响.当 DCD 为 240 mg · L⁻¹时,葛仙米生长速率显著低于对照,为对照的 49.8%.当 DCD 达到 300 mg · L⁻¹时,葛仙米生长受到进一步抑制,出现负生长,生长速率为对照的 -39.5%.

图 2 显示了田面水中 DCD 胁迫对葛仙米细胞内藻蓝蛋白(PC)和别藻蓝蛋白(APC)含量的影响.从图 2(a)中可以看出,田面水中各种质量浓度的 DCD 均造成葛仙米细胞内藻蓝蛋白(PC)含量的显著下降,但各质量浓度间不具有显著性差异,为对



注:不同字母代表处理组之间具有显著性差异($p < 0.05$),全文同.

图1 DCD对葛仙米生长速度的影响

Fig.1 Effect of DCD on the growth rate of *N. Sphaeroides*

照的 90 %,而葛仙米细胞内的别藻蓝蛋白对 DCD 的抗性 强于藻蓝蛋白,质量浓度为 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内的 DCD 对葛仙米 APC 的含量均没有显著影响(图 2(b)).

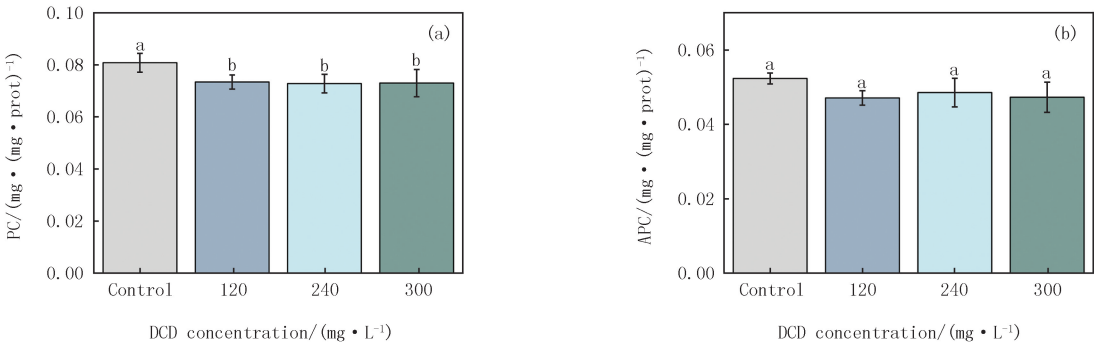


图2 DCD对葛仙米藻蓝蛋白PC(a)和别藻蓝蛋白APC(b)的影响
Fig.2 Effect of DCD on content of phycocyanin PC(a) and allophycocyanin APC(b) in cells of *N. Sphaeroides*

2.2 DCD 对葛仙米光合系统Ⅱ (PSⅡ) 的影响

从图 3(a)中可以看出,对照及各 DCD 处理组叶绿素光诱导荧光均呈现典型的 OJIP 曲线.然而,当 DCD 达到 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,P 相向右偏移.图 3(b)显示了 PSⅡ 电子传递特征和综合性能相关参数的变化特征.当 DCD 为 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,反映 PSⅡ 综合性能的参数 PI_{abs} 值显著低于对照,而且随着 DCD 质量浓度的增加而进一步降低.当 DCD 为 240 和 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,荧光动力学参数 φP_0 和 φE_0 相较于对照组均出现不同程度的下降,而 φD_0 则较对照组分别上升了 8.6% 和 6.7%.各处理组荧光动力学参数 $(1-V_k/V_j)_r$ 无显著差异.

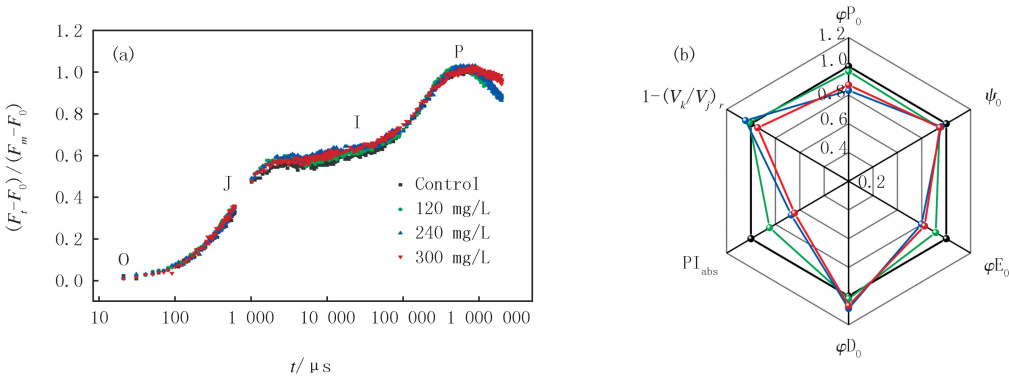


图3 DCD胁迫下葛仙米叶绿素荧光瞬态动力学曲线(a)及相关参数(b)的变化特征
Fig. 3 Variations of chlorophyll fluorescence transient kinetic curves(a) and its related parameters(b) of *N. Sphaeroides*

2.3 DCD 对葛仙米氧化-抗氧化系统的影响

葛仙米细胞内 CAT 对 DCD 胁迫响应灵敏,图 4(a)显示当 DCD 为 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,藻细胞内 CAT 活性显著高于对照,为对照的 124.2%;当 DCD 为 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,藻细胞内 CAT 活性进一步提升,为对照的 1.46 倍.DCD 为 120 和 $240\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组藻细胞内 SOD 活性均值高于对照,但是差异均没有达到显著性水平(图 4(b));当 DCD 为 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,藻细胞内 SOD 活性显著高于对照,为对照的 170.3%.从图 4(c)可以看出,DCD 胁迫导致了葛仙米细胞内类胡萝卜素与叶绿素 a 的比值升高.当 DCD 的为 240 和 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,葛仙米细胞内 Car/Chl a 比值分别较对照升高了 15.0% 和 13.6%.

图 5(a)显示了田面水中不同质量浓度 DCD 对葛仙米细胞内 ROS 含量的影响.当 DCD 为 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,葛仙米细胞内 ROS 含量与对照相比无显著差异,然而,当 DCD 为 240 和 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,藻细胞内的 ROS 含量显著高于对照,分别是对照的 1.81 倍和 1.85 倍.葛仙米细胞内 MDA 含量检测结果显示,仅当 DCD 为 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,藻细胞内 MDA 含量显著高于对照(图 5(b)),为对照的 1.37 倍.

2.4 DCD 对葛仙米固氮活性的影响

如图 6 所示,田面水中 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DCD 显著提升了葛仙米的固氮酶活性,较对照提高了 66.3%.而随

着 DCD 的进一步升高,葛仙米的固氮酶活性受到显著抑制.在 $240\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DCD 处理下,葛仙米固氮酶活性相较于对照分别降低了 50.6%和 90.8%.

3 讨论

DCD 是常用的硝化抑制剂,常被作为肥料添加剂施用于农田,抑制土壤中铵态氮的硝化作用^[5].但 Salis 等^[17]的研究发现,DCD 会对溪流中底栖藻类产生负面影响.同时陈红宇等^[10]的研究也表明,质量浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DCD 对类珠藻的生长产生了显著抑制.而本研究则显示,质量浓度为 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DCD 对葛仙米的生长无显著影响.葛仙米胞外多糖含量高,藻丝体聚集并被胞外多糖包裹,形成球状群体.有研究显示,胞外多糖有助于藻丝体抵抗环境胁迫^[18].较高的胞外多糖含量可能是葛仙米对 DCD 耐受性强于分散丝状固氮蓝藻的原因.

藻胆蛋白是蓝藻细胞内重要的捕光天线复合物组分^[19].葛仙米藻细胞内藻胆蛋白含量可以高达 7%~8%,能有效捕捉红、蓝、绿光^[19].捕光效率的强弱直接影响着葛仙米的光合作用效率,进而影响其生长和繁殖^[20].在能量传递链中,不同藻胆蛋白的位置及功能不同.PC 位于远离核心的外部区域,而 APC 更靠近藻胆体的核心部位,因此当光能被藻胆体捕获时,PC 作为外围的色素蛋白,会比 APC 更先接收到光能^[21],这代表 PC 更易受环境因子的影响.在氮源受限的情况下,藻胆蛋白可以作为氮源,满足其他蛋白质的合成^[20].而藻细胞内的 PC 含量较高,在受到环境胁迫时可能被优先分解以补充氮源,这可能是造成 PC 降低的原因.

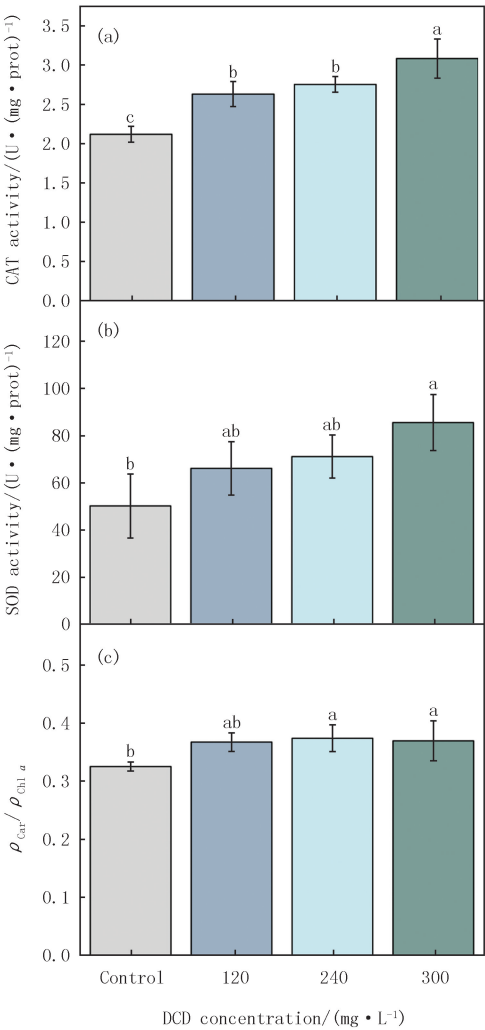


图4 DCD对葛仙米细胞内抗氧化酶CAT、SOD和非酶抗氧化物质Car/Chl a的影响
Fig.4 Effect of DCD on the antioxidative enzymes CAT and SOD as well as non-enzyme antioxidant $\rho_{Car} / \rho_{Chl\ a}$ of *N. Sphaeroides*

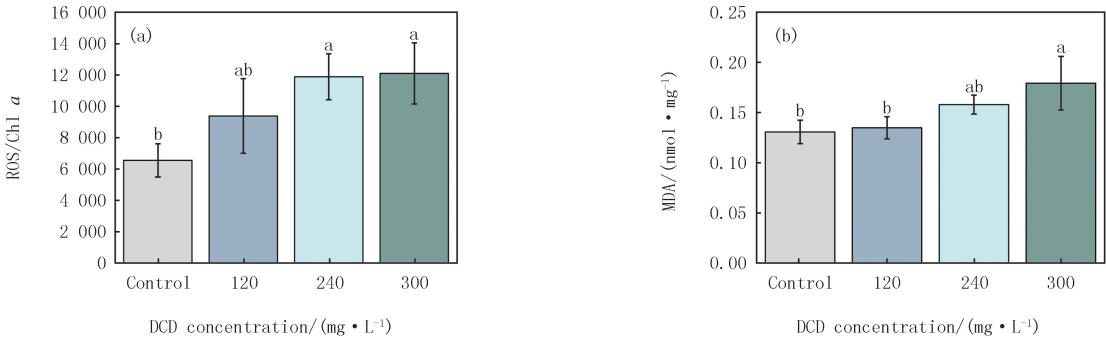


图5 DCD对葛仙米细胞内ROS(a)、MDA(b)的影响
Fig.5 Effect of DCD on the ROS(a),MDA(b) of *N. Sphaeroides*

叶绿素光诱导动力学反映了 PS II 的光化学反应效率和光电子传递状态^[16].叶绿素荧光参数 φP_0 和 ψ_0

分别反映 PS II 反应中心电子传递供体侧和受体侧的状态^[16].陈红宇等^[10]研究显示,DCD 胁迫条件下,类珠藻的 PS II 电子传递效率升高,表现为应激效应.而本研究结果显示 DCD 胁迫条件下,葛仙米叶绿素荧光参数 φP_0 显著降低,但是 ψ_0 无显著变化,据此推测 DCD 可以损伤葛仙米 PS II 电子供体侧,但是对其受体侧无显著影响.闫琼等^[22]的结果中也得到了相似的结论,脲酶抑制剂-对苯二酚造成了类珠藻 PS II 损伤,且反应中心电子供体侧更为敏感.

光合作用过程中非正常淬灭的高能电子是微藻细胞内 ROS 的主要产生源,当藻细胞的光合系统受损后,不能通过光化学反应淬灭的高能电子比率增加,从而导致细胞内 ROS 含量升高^[23].叶绿素荧光分析结果显示,DCD 胁迫能导致葛仙米 PS II 反应中心电子供体侧受损,其变化趋势与藻细胞内 ROS 含量的变化趋势基本一致.据此推测,DCD 通过损伤葛仙米的光合系统,导致藻细胞内 ROS 含量升高.藻细胞内有一套完整的抗氧化系统,用于消除细胞内的过量 ROS.正常情况下,藻细胞可以根据细胞内 ROS 的含量,通过一定的信号传导途径来调节细胞内的抗氧化酶的活性和非酶类抗氧化物质的含量.SOD 和 CAT 是细胞内两种最主要的抗氧化酶^[24].SOD 主要负责催化细胞内的超氧阴离子产生 H_2O_2 和 H_2O .CAT 则将细胞产生的 H_2O_2 进一步分解为 H_2O 和 O_2 ^[24].葛仙米细胞内的 SOD 和 CAT 活性分析结果显示,DCD 胁迫能上调葛仙米细胞内的 SOD 和 CAT 活性,这也进一步表明 DCD 导致了葛仙米受到氧化胁迫.类胡萝卜素是藻细胞内的一种非酶抗氧化物质,该物质能淬灭细胞内的 ROS,同时也可以作为一种抗氧化剂,保护膜脂免受氧化性损伤^[25].前人的研究表明,当蓝藻细胞受到氧化胁迫时,藻细胞内的类胡萝卜素含量或 $\rho_{Car}/\rho_{Chl\ a}$ 的比值升高^[11].本研究的结果也显示 DCD 胁迫导致了葛仙米细胞内 $\rho_{Car}/\rho_{Chl\ a}$ 的比值升高,该结果也从另外一个方面表明 DCD 导致葛仙米受到氧化胁迫.

MDA 是膜脂氧化反应的最终产物.细胞内 MDA 含量可以反映细胞受到的氧化性损伤情况^[26].DCD 胁迫条件下,葛仙米细胞内的氧化—抗氧化系统分析结果显示,DCD 质量浓度为 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时就可以上调藻细胞内的抗氧化系统,质量浓度为 $240\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细胞内 ROS 显著升高,而仅当 DCD 为 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,藻细胞内的 MDA 含量才显著升高.这些结果表明,低质量浓度 DCD 胁迫下,葛仙米可以通过上调藻细胞的抗氧化系统,消除 ROS,维持细胞内氧化—抗氧化系统的动态平衡,避免细胞受到氧化性损伤.只有当 DCD 的质量浓度足够高(如 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)时,藻细胞才受到氧化性损伤.

在环境胁迫条件下,细胞可以通过调整自身代谢来应对环境胁迫,减轻环境胁迫对细胞的损伤^[27].例如,受到氧化胁迫时,藻细胞能上调抗氧化酶相关基因的表达,提升抗氧化酶的合成^[27].细胞代谢的调整必然涉及多种蛋白质的合成.因此,环境胁迫条件下,细胞需要通过提高氮素的摄取或动员细胞内氮素的再分配等方式来满足新蛋白质合成对氮素的需求^[28].生物固氮则是固氮蓝藻在缺氮条件下获取外源氮素的主要方式,环境胁迫条件下,固氮微生物可以通过提高固氮酶的活性满足细胞对氮素的需求.在本研究中,低质量浓度 DCD 胁迫条件下,葛仙米可能通过上调固氮酶的活性满足细胞调整代谢过程中对氮素的需求.然而,生物固氮是一个高耗能的过程^[29],高质量浓度 DCD 胁迫条件下,葛仙米光合作用效率显著降低,导致细胞通过光合作用合成生物能效率降低.细胞内能量供应不足可能是高质量浓度 DCD 胁迫条件下葛仙米固氮活性下降的重要原因.

4 结论

在田面水培养条件下,DCD 胁迫对葛仙米的生长和光合作用有显著抑制作用,导致藻细胞内 ROS 含量

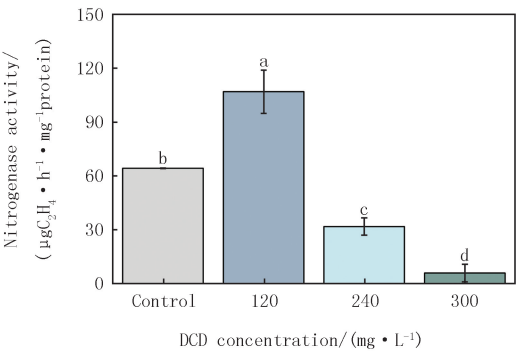


图6 DCD对葛仙米固氮酶活性的影响
Fig.6 Effect of DCD on the N₂ fixation rate of *N. Sphaeroides*

显著升高,进而导致细胞膜脂发生氧化性损伤.此外,低质量浓度的 DCD 可增强葛仙米的固氮活性,但当质量浓度大于等于 $240\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其固氮活性受到显著抑制.因而,培育葛仙米的稻田,为了减少 DCD 对葛仙米生长和代谢的负面影响,建议稻田田面水中 DCD 质量浓度不宜超过 $120\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

参 考 文 献

- [1] 王庆贵,张晓莹.土壤微生物对大气氮沉降的响应研究进展[J].河南师范大学学报(自然科学版),2021,49(6):11-18.
Wang Q G,Zhang X Y.Response of soil microorganisms to atmospheric nitrogen deposition:a review[J].Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition),2021,49(6):11-18.
- [2] Zhang Y J,Ye C,Su Y W,et al.Soil Acidification caused by excessive application of nitrogen fertilizer aggravates soil-borne diseases:Evidence from literature review and field trials[J].Agriculture Ecosystems and Environment,2022,340:108176.
- [3] Huang L B,Chakrabarti S,Cooper J,et al.Ammonia-oxidizing archaea are integral to nitrogen cycling in a highly fertile agricultural soil [J].ISME communications,2021,1(1):19.
- [4] Beekman F,Motte H,Beekman T.Nitrification in agricultural soils:impact,actors and mitigation[J].Current Opinion in Biotechnology,2018,50:166-173.
- [5] Moir J L,Cameron K C,Di H J.Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide on soil mineral N,pasture yield,nutrient uptake and pasture quality in a grazed pasture system[J].Soil Use and Management,2007,23(2):111-120.
- [6] Abinandan S,Subashchandrabose S R,Venkateswarlu K,et al.Soil microalgae and cyanobacteria:the biotechnological potential in the maintenance of soil fertility and health[J].Critical Reviews in Biotechnology,2019,39(8):981-998.
- [7] Song X N,Zhang J L,Peng C R,et al.Replacing nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing cyanobacteria reduced nitrogen leaching in red soil paddy fields[J].Agriculture Ecosystems and Environment,2021,312:107320.
- [8] 邵继海,陈杰锋,胡婷.林氏念珠藻对酸化稻田水稻产量和土壤细菌群落结构与功能的影响[J].河南师范大学学报(自然科学版),2022,50(6):22-28.
Shao J H,Chen J F,Hu T.Effects of *Nostoc linckia* on rice grain yield and the structure and functions of bacterial community in acidified paddy soil[J].Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition),2022,50(6):22-28.
- [9] 郭宏勇,朱俊杰,沈伊洁,等.高质量浓度 CO_2 与磷质量浓度对葛仙米生长和光合作用的耦合效应[J].水生生物学报,2022,46(7):1045-1051.
Guo H Y,Zhu J J,Shen Y J,et al.Interactive effects of elevated CO_2 and phosphorus on the growth and photosynthesis in *Nostoc sphaeroides*[J].Acta hydrobiologica sinica,2022,46(7):1045-1051.
- [10] 陈红宇,邵继海,陈杰锋,等.硝化抑制剂双氰胺对类珠藻(固氮蓝藻)生长和生理生化特征的影响[J].生态毒理学报,2024,19(3):331-341.
Chen H Y,Shao J H,Chen J F,et al.Effect of nitrification inhibitor dicyandiamide on growth,physiological and biochemical characteristics of *Aliinostoc* sp.(Diazotrophic Cyanobacteria)[J].Asian Journal of Ecotoxicology,2024,19(3):331-341.
- [11] Gauthier M R,Senhorinho G N A,Scott J A.Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants[J].Algal Research-Bio-mass Biofuels and Bioproducts,2020,52:102104.
- [12] Liao J M,Sun B,Wang C,et al.Uptake and cellular responses of *Microcystis aeruginosa* to PFOS in various environmental conditions[J].Ecotoxicology and Environmental Safety,2024,272:116041.
- [13] 刘发波,郎明,马笑,等.硝化抑制剂类型和剂量对不同土壤硝化抑制作用机理的研究[J].中国土壤与肥料,2022(8):66-75.
Liu F B,Lang M,Ma X,et al.Study on the mechanism of nitrification inhibitor type and dosage in different soils[J].Soil and Fertilizer Sciences in China,2022(8):66-75.
- [14] Basheva D,Moten D,Stoyanov P,et al.Content of phycoerythrin,phycocyanin,allophycocyanin and phycoerythrocyanin in some cyanobacterial strains:Applications[J].Engineering in Life Sciences,2018,18(11):861-866.
- [15] Lin Y Q,Chen A W,Wu G Y,et al.Growth,microcystins synthesis,and cell viability of *Microcystis aeruginosa* FACHB905 to dissolved organic matter originated from cattle manure[J].International biodeterioration and biodegradation,2017,118:126-133.
- [16] Yan Q,Xiao P,Li J,et al.Physiological responses of a diazotrophic cyanobacterium to acidification of paddy floodwater: N_2 fixation,photosynthesis,and oxidative-antioxidative characteristics [J].International Journal of Environmental Research and Public Health,2022,19(22):15070.
- [17] Salis R K,Bruder A,Piggott J J,et al.Multiple-stressor effects of dicyandiamide(DCD)and agricultural stressors on trait-based responses of stream benthic algal communities[J].Science of the Total Environment,2019,693:133305.
- [18] Kumar D,Kastanek P,Adhikary S P.Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application[J].Current Science,2018,115(2):234-241.
- [19] 余佳,王生,许文琦,等.葛仙米藻胆蛋白粗提物、藻蓝蛋白和藻红蛋白的体外抗氧化活性比较研究[J].食品研究与开发,2019,40(23):

104-108.

Yu J, Wang S, Xu W Q, et al. Comparative studies on the antioxidant of phycobiliprotein crude extract, phycocyanin and phycoerythrin in *Nostoc sphaeroides*[J]. Food Research and Development, 2019, 40(23): 104-108.

[20] 贾晓会, 甘婉怡, 马文喧, 等. 藻胆蛋白的特性、应用、提取及展望[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2023, 59(4): 584-591.

Jia X H, Gan W Y, Ma W X, et al. Characteristics, applications, extraction and research prospect of phycobiliprotein[J]. Journal of Beijing Normal University(Natural Science) 2023, 59(4): 584-591.

[21] Dagnino-Leone J, Figueroa C P, Castañeda M L, et al. Phycobiliproteins: Structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2022, 20: 1506-1527.

[22] 闫琼, 邵继海, 陈杰锋, 等. 对苯二酚对类珠藻的生物毒性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(5): 624-630.

Yan Q, Shao J H, Chen J F, et al. Bio-toxicity of hydroquinone on *Aliinostoc*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(5): 624-630.

[23] Zhang M, Ming Y, Wang H B, et al. Strategies for adaptation to high light in plants[J]. aBIOTECH, 2024, 5(3): 381-393.

[24] Wan L, Wu Y, Zhang B, et al. Effects of moxifloxacin and gatifloxacin stress on growth, photosynthesis, antioxidant responses, and microcystin release in *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 409: 124518.

[25] Maslova T G, Markovskaya E F, Slemnev N N. Functions of Carotenoids in Leaves of Higher Plants(an overview)[J]. Biology Bulletin Reviews, 2020, 81(4): 297-310.

[26] Xie L J, Ma Z X, Yang G R, et al. Study on the inhibition mechanism of eucalyptus tannins against *Microcystis aeruginosa*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 249: 114452.

[27] Guan N Z, Li J H, Shin H D, et al. Microbial response to environmental stresses: from fundamental mechanisms to practical applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(10): 3991-4008.

[28] Ye J Y, Tian W H, Jin C W. Nitrogen in plants: from nutrition to the modulation of abiotic stress adaptation[J]. Stress Biology, 2022, 2(1): 4.

[29] Wang H B, Li H, Zhang M L, et al. Carbon dots enhance the nitrogen fixation activity of *azotobacter chroococcum*[J]. ACS Applied Materials and Interfaces, 2018, 10(19): 16308-16314.

Bio-toxicity of nitrification inhibitor dicyandiamide on *Nostoc sphaeroides*

Shao Jihai, Feng Danyi, Feng Ye, Jin Wenxi, Tan Yaqi

(College of Environment and Ecology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In order to accurately evaluate bio-toxicity of nitrification inhibitor dicyandiamide(DCD) on diazotrophic cyanobacteria and provide useful information on reasonable application of DCD and diazotrophic cyanobacteria in agricultural fields, this study investigated the effects of DCD on growth, photosynthesis, nitrogen-fixing activity, and the oxidative-antioxidative characteristics of an edible diazotrophic cyanobacterium *Nostoc Sphaeroides* in paddy flooded water. The results showed that, DCD, at a concentration of 240 mg • L⁻¹, significantly inhibited the growth of *N. Sphaeroides*. And also, DCD decreased the content of phycocyanin(PC), severely damaged the PS II, and increased reactive oxygen species(ROS) in cells of *N. Sphaeroides*. The intracellular antioxidant defense system could eliminate oxidative stress induced by low level of DCD. However, high level of DCD(300 mg • L⁻¹) resulted in oxidative damage on cells of *N. Sphaeroides*. The dinitrogen-fixing activity of *N. Sphaeroides* was promoted by low level of DCD, but it was significantly inhibited by DCD at a concentration of ≥240 mg • L⁻¹. Based on these findings, it is recommended that the DCD concentration in paddy flooded water where *N. Sphaeroides* is cultivated should not exceed 120 mg • L⁻¹.

Keywords: growth rate; photosynthetic system; oxidative-antioxidant system; dinitrogen-fixing enzyme activity

[责任编辑 刘洋 赵晓华]