

环境因子对浒苔生长及生源硫释放的影响*

谭婷婷^{1,3} 刘春颖^{1,3①} 刘涛² 许高宾¹ 张磊² 邓雪^{1,3} 陆小兰^{1,3}

(1. 中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室 青岛 266100; 2. 中国海洋大学生命学院 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266071)

摘要 近年来,我国黄海海域大规模暴发的绿潮现象对海洋生态环境和海水中的物质迁移转化产生了重要影响。而浒苔作为绿潮暴发过程中的主要藻类,是释放二甲基硫(DMS)的优势藻类,其对海水中硫酸盐吸收转化及生源硫释放发挥着重要作用。本文通过实验室培养探讨了温度、盐度及不同形态氮营养盐对浒苔生长及释放生源硫化物的影响。结果表明,在实验范围内(盐度为 25—35,温度为 20—25°C),盐度对浒苔生长无明显影响,但盐度增加会促进 β -二甲基巯基丙酸内酯(DMSP)的合成。在温度为 20°C 盐度为 35 时,DMSP 释放达到最大值。温度增加能够促进浒苔的增长,在培养第 5 天,25°C 下浒苔湿重比 20°C 增加了 25%左右。培养液中的 DMS 含量为 20nmol/L 左右,约是正常黄海水的 4 倍,DMSP 的浓度更是高于正常海水的数十倍。增加无机氮浓度会促进浒苔的生长及 DMS 和 DMSP 的释放,相比之下, NH_4^+ -N 比 NO_3^- -N 更易被浒苔吸收利用,添加两种氮源组 DMS 和 DMSP 的最高含量均比空白组高 60%和 30%左右。DMS/DMSP 的值在 10%以内变化,培养过程中 DMSP 表观降解比 AA(丙烯酸)/(AA+DMSP)总体上低于 40%。

关键词 浒苔; 生长; 环境因子; 二甲基硫(DMS); β -二甲基巯基丙酸内酯(DMSP)

中图分类号 Q945 **doi:** 10.11693/hyhz20171200314

绿潮是海洋中大型绿藻大规模繁殖导致其在潮间带和浅海区生物量大量积累而形成的一种异常的生态现象(Charlier *et al.*, 2007)。近年来,中国黄海海域所暴发的绿潮被认为是世界上规模最大的藻华现象,而浒苔则被确认为绿潮中具有明显优势的藻种(汪文俊等, 2008; Liu *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2011)。浒苔对光强、温度和盐度等环境因素具有非常强的适应能力(Luo *et al.*, 2011),使其在富营养化的水体中能够出现爆发性增长。一定范围内,温度增加能提高藻内酶活性,促进光合作用,从而促进浒苔增长及生长状态的变化。海水中盐度的变化使得藻类细胞外部压力改变,细胞内溶液浓度发生改变,进一步影响到浒苔的新陈代谢等过程。而营养盐是影响海水中植物生长的重要因素,充足的营养盐有利于藻类生长,其中,

NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 是影响浒苔生长的最主要氮源(田千桃等, 2010)。

二甲基硫(DMS)是海水中占有明显优势地位、含量最为丰富的挥发性生源有机硫化物,同时也是海洋向大气中排放的最为重要的硫化物(杨桂朋等, 2004; Lana *et al.*, 2011)。海洋所排放的 DMS 作为大气中硫化物的主要来源,其在大气中可以被迅速氧化并最终形成硫酸盐气溶胶。因此, DMS 在海洋硫循环及全球气候变化中发挥着不可忽视的作用。DMS 的前体物质 β -二甲基巯基丙酸内盐(DMSP)主要存在于海洋浮游植物体内,是藻类一种主要的硫代谢产物,在藻类细胞中可以起到调节渗透压的作用(Karsten *et al.*, 1996; Sunda *et al.*, 2002)。DMSP 在裂解酶作用下释放 DMS 并生成丙烯酸(AA)。浒苔作为海洋中的大

* 国家自然科学基金项目, 41676065 号; 中央高校基本科研业务费专项, 201762032 号; 国家重点研发计划, 2016YFA0601301 号, 2016YFC1402101 号; 青岛市民生科技计划, 15-8-2-4-hy 号。谭婷婷, 博士研究生, E-mail: tantingting@stu.ouc.edu.cn

通讯作者: 刘春颖, 博士生导师, 教授, E-mail: roseliu@ouc.edu.cn

收稿日期: 2017-12-14, 收修改稿日期: 2018-05-12

型绿藻类,可以从海水中吸收硫酸盐,在藻体内通过同化作用生成大量的 DMSP (Steinke *et al.*, 1996; Van Alstyne *et al.*, 2001), 从而影响海水中的硫循环, 而这一过程受到营养盐等环境因子的限制(Sunda *et al.*, 2007; Spielmeyer *et al.*, 2012)。

近年来,绿潮在世界范围内发生的频率和规模越来越大,而其对海洋硫循环的影响尚未有深入研究。本研究通过对浒苔进行实验室模拟培养,探讨在不同温度、盐度和营养盐条件下浒苔生长和海水中有有机硫代谢产物的变化,从而了解绿潮暴发过程中生源硫的迁移转化和对海洋生态系统的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

2015年3月,于江苏省如东市近海的紫菜棚架上采集附着在棚架和绳梗上的绿藻,经生物鉴定确定为浒苔。从中挑选生理状态较好的浒苔,实验前将其置于经过0.22 μm 醋酸纤维滤膜过滤后的自然海水中黑暗条件下饥饿培养3天。

培养所用海水取自于青岛近海崂山海域。用0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤去除颗粒物,随后用酸泡洗净后的5L锥形瓶为容器用高压灭菌锅(LDZX-50KBS,上海申安医疗器械厂)高压灭菌20min (0.15MPa),待冷却后充分摇动来恢复溶解气体含量,调节pH为8.10 $\pm$ 0.05待用。

用分析天平(Mettler Toledo, 瑞士)准确称取NaNO₃(分析纯,上海国药化学试剂公司)和NH₄Cl(分析纯,上海国药化学试剂公司),配制浓度均为0.16mol/L的母液备用。

1.2 实验设计

1.2.1 不同温盐条件下的培养 首先,根据f/2配方(Guillard *et al.*, 1962)添加营养盐,配制成培养液,根据文献报道的可能影响浒苔生长的温盐范围(姚雪, 2011),设置4种不同的温盐条件:第I组温度 $T=20^{\circ}\text{C}$,盐度 $S=25$;第II组 $T=20^{\circ}\text{C}$, $S=30$;第III组 $T=20^{\circ}\text{C}$, $S=35$;第IV组 $T=25^{\circ}\text{C}$, $S=30$ 。每组条件设立三组平行样,每组培养体积为4L,初始生物量密度为1.0g/L。培养条件:培养温度参照方案设计,光暗比为12h:12h,光照强度为8000lx。取样采集:每隔5天取一次样,5天为一个周期连续培养5个周期,培养期间不换水。

1.2.2 不同氮源下的培养 根据文献报道,与浒

苔生长关系密切的无机氮是NO₃⁻-N和NO₄⁺-N(王婷等, 2011),故进行了添加NO₃⁻-N和NO₄⁺-N的培养实验。两组添加浓度梯度均为0(对照)、5、10、20、40和200 $\mu\text{mol/L}$ 。每个梯度浓度设立4组平行样,每组培养体积为3L,初始生物量密度为0.4g/L。培养条件:培养室中的培养温度为(20 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$,光暗比为12h:12h,光照强度为8000lx。取样采集:每隔5天取一次样并重新换水添加NO₃⁻-N和NO₄⁺-N,5天为一个周期连续培养6个周期。

1.3 样品的采集与测定

浒苔的湿重:将浒苔用200目的滤网进行过滤,再用吸水纸吸干藻体上的水后,使用分析天平进行称重,并记录培养过程中浒苔湿重变化。

DMS 样品的采集与测定:用移液枪分别取2mL海水样品至两个干燥的10mL血清瓶中并迅速加盖密封,取样完毕后立即进行测定。用高纯氮气($\geq 99.999\%$,青岛豪森新能源有限公司)将血清瓶内海水中的DMS以20mL/min流速吹出,富集于浸泡在液氮冷阱中的捕集管中。3.5min后用热水进行加热解析,释放的DMS随载气进入气相色谱仪(GC-6850,美国安捷伦公司),经过火焰光度检测器检测记录峰面积,最后利用工作曲线计算样品中DMS浓度,检测限为0.4nmol/L。

DMSP 样品的采集与测定:移液枪移取4mL海水样品于4mL离心管中,添加40 μL 50%的浓硫酸进行酸化后,密封冷藏保存,实验结束后进行测定。加入200 μL 浓度为10mol/L的KOH浓溶液,在密封冷藏条件下碱解24小时,将DMSP转化为等摩尔量的DMS然后进行测定(Yang *et al.*, 2008)。

AA 样品的采集与测定:从培养液中取4mL海水样品于4mL离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存,培养结束后统一测定。将待测海水样品使用0.2 μm Whatman玻璃纤维重力滤器过滤(除去海水样品中颗粒物的同时防止细胞在过滤的过程中破裂)后,使用高效液相色谱仪(L-2000,日本日立)进行测定,检出限为4nmol/L(刘春颖等, 2013)。

1.4 浒苔平均生长速率的计算

浒苔在生长阶段其重量的增加并不是恒定的,本文使用公式(1)计算其一个培养周期的平均生长速率(李瑞香等, 2009):

$$K_i = \left(\sqrt[n]{\frac{M_{i+1}}{M_i}} - 1 \right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中, K_i 表示第 i 个周期内的平均生长速率, M_{i+1} 表示第 $i+1$ 次测量的浒苔的湿重, M_i 表示第 i 次浒苔的湿重, n 表示一个周期的天数。

1.5 数据分析

使用 Origin7.5 软件进行作图分析, 用 SPSS16.0 进行显著性讨论分析。

2 结果与分析

2.1 不同温盐条件下浒苔生长及 DMSP 和 DMS 的释放

2.1.1 浒苔的生长变化 不同温度和盐度条件下浒苔在各阶段的湿重变化和相对平均增长率如图 1 所示。培养周期内 4 组浒苔均表现出不断增长的趋势, 且前期的相对平均增长率明显高于后期, 增长速度较快, 而在后期增长较为缓慢。从图 1a 中可以看出, 在前 15 天, 浒苔的生长较快, 后期增长速度较慢; 且在盐度为 30, 温度为 25°C 下的浒苔湿重增加较快, 在第五天时达到了 6.52g, 比前三组的 5.91、5.22 和 6.13g 分别高了 10.3%、24.9%和 6.4%。将第 1 组与

前三组 浒苔湿重做单因素方差分析 ($P=0.002$, $P=0.008$, $P=0.001$, one-way ANOVA), 表明第 1 组与前三组 浒苔湿重存在显著性差异。此外, 其在前 5 天相对平均增长率达到最大值 7.13%, 在后期该条件下 浒苔的增长速率则低于其他组。此外, 本实验室在 浒苔的营养盐动力学探究实验中发现, 浒苔对 NO_3^- -N 和 PO_4^{3-} -P 的吸收速率和时间呈现出幂函数的关系, 这与王阳阳等(2011)的研究结果一致。在 NO_3^- -N 的初始浓度为 200mol/L, PO_4^{3-} -P 的初始浓度为 20mol/L 时, 浒苔对 NO_3^- -N 和 PO_4^{3-} -P 的吸收速率最高可达 22.79 和 1.72 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 因此在培养后期营养盐不足可能是 浒苔生长速率降低的主要因素。由图 1b 可知, 在前 5 天, 四组的相对平均增长率均高于 5%, 而在第 20—25 天, 平均增长率降到 1%以下。第 I、II、III 组 浒苔的增长趋势较为一致, 均呈现出前期增长速度快后期慢的特点, 平均增长率分别为 2.77%、2.74% 和 2.65%, 这说明在研究的温度和盐度范围内, 增加温度可以一定程度促进 浒苔的生长, 而盐度变化对 浒苔生长的影响较小。

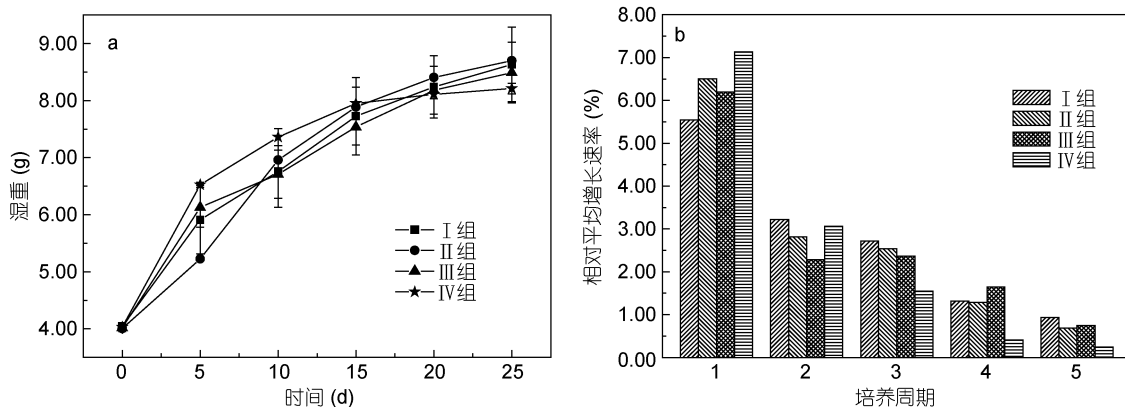


图 1 在不同温盐条件下浒苔的湿重变化(a)和相对平均增长率(b)

Fig.1 Variation in wet weight (a) and average growth rates (b) of *Ulva prolifera* under a different temperature-salinity condition

2.1.2 DMS 和 DMSP 的变化 四种条件下培养周期内培养液中 DMS 和 DMSP 及相关比值变化范围与平均值如表 1 所示。在整个培养周期内 DMS 的变化如图 2a 所示。整体而言, DMS 在初始阶段有一个低值, 第 I、III、IV 组 DMS 浓度变化趋势一致, 表现出先增大后减少的变化趋势, 并在第 10—15 天释放达到最大值。第 III 组在第 15 天出现一个明显的 DMS 高值(33.58nmol/L), 而第 II 组则表现出持续增加的趋势且在第 25 天时达到 40.11nmol/L 的高值。总体上来讲, 在 $S=30$, $T=20^\circ\text{C}$ 下 DMS 的释放达到最大; 而在低温低盐即 $S=25$, $T=20^\circ\text{C}$ 时 DMS 浓度明显低于其

他三组, 说明低温低盐不利于 浒苔对 DMS 的产生和释放。

培养过程中各组 DMSP 的变化如图 2b 所示, 培养过程中 DMSP 的浓度较初始值有明显的提高。与其他三组相比, DMSP 的浓度在盐度最高($S=35$)时最大且一直维持在一个较高的水平。这一结果与 Van Alstyne 等(2005)的研究结果一致。他们使用不同盐度的人工海水对大型绿藻石莼培养并对 DMSP 产量进行测定。培养 4 周以后, 石莼内 DMSP 含量最高值出现在盐度最高的一组中, 比标准人工海水培养的高了 23%。而在本研究中, 盐度为 35 时的 DMSP 浓度

比盐度为 30 的高 6%—60%，这可能是由于随着海水中盐度的升高，藻体细胞外部所受压力增大，促使藻细胞吸收海水中硫酸盐经同化还原作用合成更多的 DMSP 以调节维持细胞内的渗透压(Yoch *et al.*, 1997; Stefels, 2000)。在盐度均为 30 时，DMSP 释放量在 25℃ 时较高，表明温度适当升高有利于 DMSP 的合成。

表 1 不同温盐下培养液中 DMS 及相关参数的变化
Tab.1 Changes of DMS and the relative parameters in different temperature-salinity culture media

实验组	温度(℃)	盐度	DMS (nmol/L)	DMSP (nmol/L)	DMS/DMSP (%)	AA/(AA+DMSP) (%)
	20	25	7.32—22.41 (13.47)	123.56—404.97 (287.71)	2.7—6.6 (4.7)	16.5—45.0 (29.1)
	20	30	6.23—40.11 (22.18)	162.21—365.73 (295.43)	3.2—8.3 (6.1)	9.8—46.0 (29.4)
	20	35	7.63—33.58 (19.51)	134.52—454.05 (364.85)	2.7—8.2 (5.3)	11.3—40.0 (27.9)
	25	30	8.01—27.07 (17.33)	156.24—410.25 (311.14)	4.3—7.4 (5.6)	14.1—52.0 (36.4)

注: DMS: 二甲基硫; DMSP: β-二甲基巯基丙酸内酯; AA: 丙烯酸

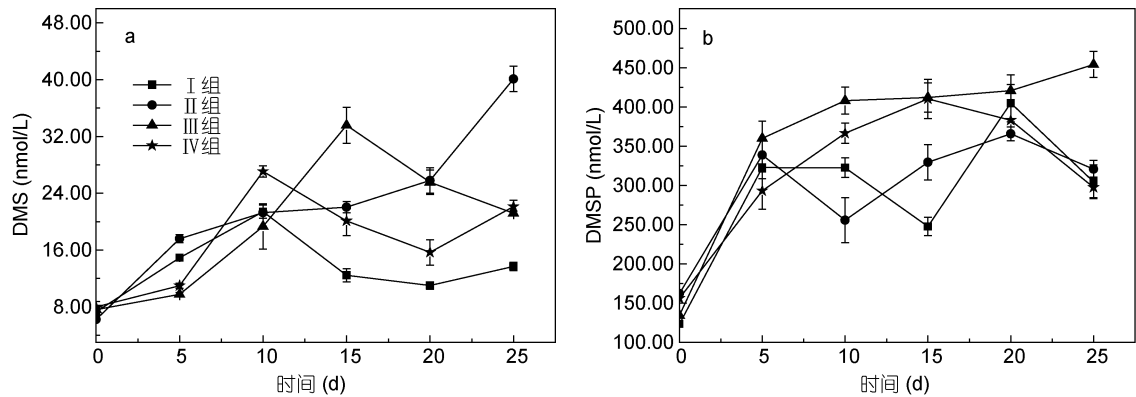


图 2 在不同温盐条件下浒苔释放 DMS (a)和 DMSP (b)的变化趋势
Fig.2 Changes in the concentrations of DMS (a) and DMSP (b) releases from *Ulva prolifera* under different temperature-salinity conditions

2.2 不同形态的无机氮对浒苔生长和硫代谢产物的影响

2.2.1 浒苔的生长变化 已有研究表明，一般大型藻类对氮的吸收速率要高于磷的吸收速率，其中，浒苔对氮有很高的需求，氮对浒苔的生长限制作用也比磷高(李瑞香等，2009)，与浒苔生长密切相关的无机氮主要是 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 。因每个周期初期都更换海水并添加相应浓度的无机氮，因此培养液中磷及其他营养盐浓度均接近正常海水浓度，影响实验组之间浒苔生长及硫释放的变量为无机氮的添加浓度。海水中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 初始浓度分别为 0.09、4.74、8.75 和 $0.25\mu\text{mol/L}$ ；添加不同浓度的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 后浒苔的湿重变化及平均增长率如图 3 所示，整个培养周期中 DMS 和 DMSP 变化如表 2 所示。以 NaNO_3 为外加氮源时，在前 20 天，浒苔的湿重随着时间增长而增加，且在第 1 个和第 4 个周期的增长速度较快。而在第 20—25 天，浒苔的湿重趋于平稳甚至是出现负增长，这说明浒

苔进入衰亡期。以 NH_4Cl 为外加氮源时，5 组实验组也表现出相同的生长趋势。总体而言，浒苔的湿重随着添加 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 或 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度的升高而增加，且生长状况都优于空白组。在整个培养阶段，浒苔湿重增加了 40.8%—88.3%，实验组浒苔的平均增长速率均大于 1.5%，而对照组的平均增长速率只有 1.4%。此外，添加 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的浒苔其平均增长速率要明显高于添加同浓度的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浒苔，这表明 NH_4^+ 状态的无机氮更容易被浒苔吸收利用并促进其自身生长。对于大型藻类而言，其对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收速率大于对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的吸收速率，这主要是由于藻体可以直接吸收 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 来加以利用(Dortch, 1990; 李靖等, 2012)。

2.2.2 不同氮源下 DMS 和 DMSP 变化 添加不同浓度氮源后培养液中 DMS 和 DMSP 的平均浓度如图 4 所示(平均浓度: 每组培养至第 5 天每个周期 DMS 和 DMSP 增加的平均浓度)。以 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为添加氮源时，DMS 的浓度分别为 8.73—11.38nmol/L 和 8.04—11.05nmol/L。添加氮源后 DMS

表 2 不同 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度下培养液中 DMS 和 DMSP 含量的变化
Tab. 2 Changes of DMS and DMSP contents under different $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ concentrations

实验组	添加 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($\mu\text{mol/L}$)	添加 NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$)	实测 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($\mu\text{mol/L}$)	实测 NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$)	DMS (nmol/L)	DMSP (nmol/L)
1-0	0	0	2.537	14.608	4.83—8.49 (6.76)	190.97—462.59 (303.10)
1-1	5	0	9.589	15.469	6.00—12.85 (8.73)	211.72—436.25 (339.47)
1-2	10	0	18.869	15.274	5.33—11.86 (8.76)	221.54—527.85 (407.35)
1-3	20	0	27.558	21.147	6.16—13.09 (8.86)	193.91—550.68 (411.39)
1-4	40	0	37.832	10.176	5.50—15.01 (11.57)	195.73—437.17 (329.98)
1-5	200	0	241.263	17.807	6.46—14.90 (10.14)	194.95—494.95 (407.18)
2-1	0	5	4.843	17.938	7.71—16.09 (11.05)	220.63—462.59 (409.35)
2-2	0	10	5.577	27.151	5.64—13.88 (9.09)	212.96—490.43 (375.89)
2-3	0	20	7.052	29.529	5.72—13.05 (8.04)	215.40—455.86 (391.52)
2-4	0	40	8.963	48.703	4.98—13.54(8.54)	191.21—530.38 (349.26)
2-5	0	200	1.699	115.069	5.67—14.60 (9.69)	210.82—421.64 (323.46)

的平均浓度均高于无添加对照组的 6.76nmol/L。添加 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 后, DMS 平均浓度随着添加浓度的升高而增大。而添加 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的浒苔培养中则随添加浓度的升高呈现出先减小后增加的趋势。DMSP 随添加浓度的变化不明显但一直维持在一个较高的水平, 浓度在 300—500nmol/L, 这表明浒苔在生长过程中会合成并释放大量的 DMSP。添加氮盐各实验组中 DMS 和 DMSP 的浓度均高于对照组。添加 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 实验组中 DMS 和 DMSP 的最高含量分别超出空白组 68.3%和 34.9%, 而添加 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 组 DMS 和 DMSP 的最高含量分别超出空白组 63.5%和 34.2%, 这说明氮盐对浒苔生长过程中合成释放 DMSP 和 DMS 具有明显的促进作用。

3 讨论

在海水中, DMS 的前体物质 DMSP 是藻类活动的代谢产物, 已有研究表明, 约有 95%的 DMS 来源于海洋中的浮游植物(Charlson *et al.*, 1987)。浒苔作为 DMSP 和 DMS 的高产藻种, 其在海水中大规模的暴发、生长等过程势必会引起海水中 DMSP 和 DMS 的增加和积累。而高浓度的 DMS 会通过海气交换等途

径释放到大气中, 进一步氧化对环境造成重要的影响。Nguyen 等(1992)提出 DMS 的氧化产物 SO_2 对酸雨酸度的贡献可达 40%, 是其主要的物质来源。Zhang 等(2008)于 2006 年未有浒苔暴发前测得黄海海域表层海水中 DMS 和 DMSP 的平均浓度只有 5.42 和 26.72nmol/L。而在本研究中, 浒苔初始生物量密度仅为 1.0g/L 时, 培养液中的 DMS 含量就达到 20nmol/L 左右, DMSP 的浓度更是高于正常海水的数十倍。因此, 对绿潮期间海水中生源硫的研究具有重要意义。在培养实验中, 浒苔的生物密度会随实验推进而逐步增加, 而生理状态会逐渐变差, 造成生长率下降。研究表明, 藻类在衰亡期会向水体中释放更多的 DMSP, 并进一步分解释放 DMS(杨桂朋等, 2004)。随着培养过程中生物密度的增加, 水体中的 DMSP 浓度升高。实验结果表明单位生物量对应的 DMSP 量在培养初期明显增加, 第 1 组即盐度最高的一组 DMSP 由最初的 33.46nmol/(g·h)增加至第 15 天的 60.81nmol/(g·h), 而在后期这一数值趋于稳定状态。水温的变化可以改变生物的生理状态和生物量, 从而影响其向海水中释放 DMSP 的量。海水温度的升高会促进浒苔的生长和 DMSP 裂解酶活性的增加,

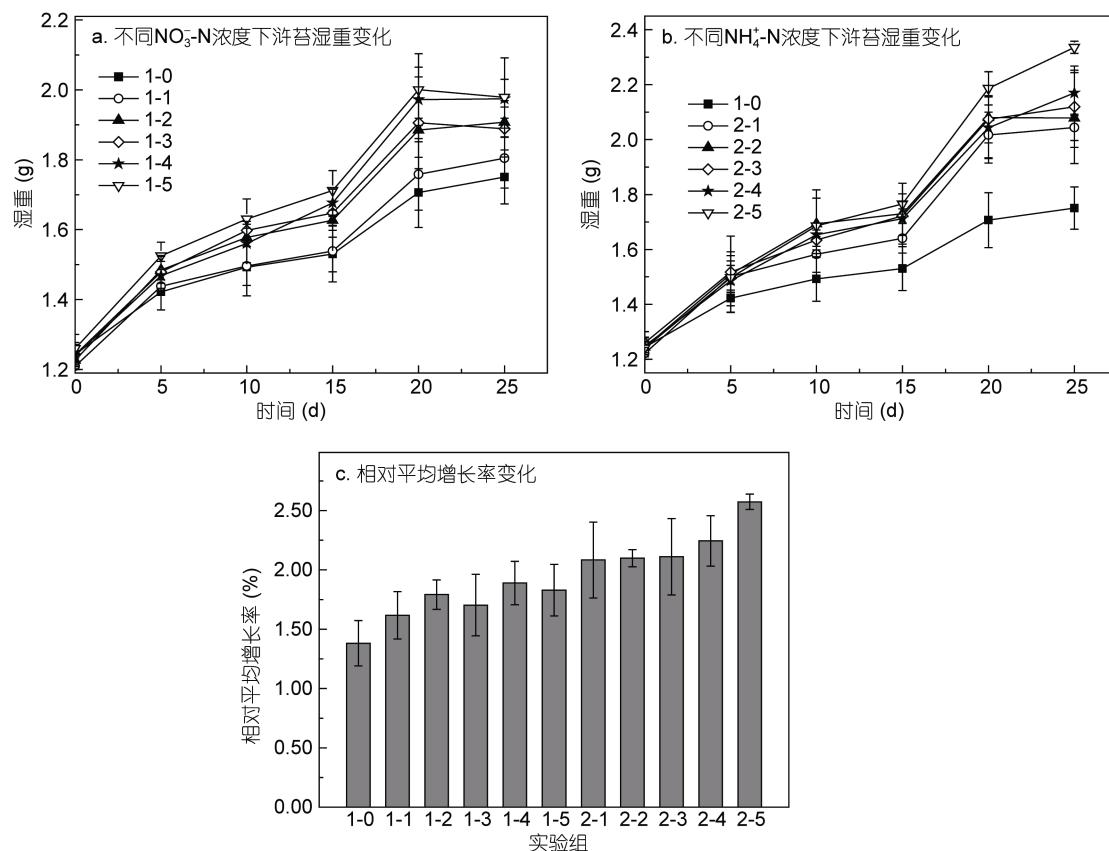


图3 浒苔在两种氮源下的湿重变化和平均增长率

Fig.3 Changes in wet weight and average growth rate of *Ulva prolifera* cultured in the two nitrogen sources

a: NO_3^- -N; b: NH_4^+ -N; c: the relative changes of all groups

注: 1-0: 对照(无外加氮源); 1-1: NO_3^- -N ($5\mu\text{mol/L}$); 1-2: NO_3^- -N ($10\mu\text{mol/L}$); 1-3: NO_3^- -N ($20\mu\text{mol/L}$); 1-4: NO_3^- -N ($40\mu\text{mol/L}$); 1-5: NO_3^- -N ($200\mu\text{mol/L}$); 2-1: NH_4^+ -N ($5\mu\text{mol/L}$); 2-2: NH_4^+ -N ($10\mu\text{mol/L}$); 2-3: NH_4^+ -N ($20\mu\text{mol/L}$); 2-4: NH_4^+ -N ($40\mu\text{mol/L}$); 2-5: NH_4^+ -N ($200\mu\text{mol/L}$)

图c为浒苔5个培养周期相对平均增长率的平均值,代表浒苔整个培养周期平均每天的相对增长率

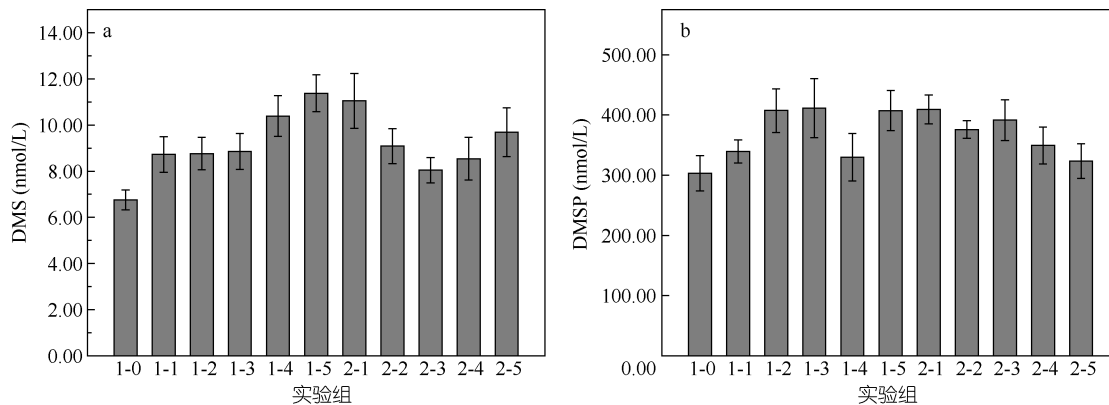


图4 不同氮源条件下 DMS (a)和 DMSP (b)的平均浓度

Fig.4 Average concentrations of DMS (a) and DMSP (b) in different nitrogen forms and concentrations of all groups

进而促进 DMS 的生成。由于浒苔是一种广温广盐的大型藻类, 盐度变化对其生长的影响并不明显。但盐度增加会促使藻细胞合成更多的 DMSP 来维持渗透压。此外, 由于培养前 5 天浒苔生长较快, 生物量增

加迅速, 水体中硫酸盐被快速吸收同化并在藻体内合成 DMSP, 水体中 DMSP 含量在前 5 天有大幅度的提升, 而 DMS 作为 DMSP 的分解产物, 表现出一定的滞后性。田千桃等(2010)通过实验研究发现, 当

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度大于 $1\mu\text{mol/L}$ 时, 浒苔对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的吸收接近为零。且随着培养液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度的增加, 浒苔依然优先吸收 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 。该结果与本研究浒苔在以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为营养物质的培养液中生长较快相吻合。这主要是因为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的吸收过程比 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收需要更多的能量(Flynn, 1991)。

基于 DMSP 的两种主要降解途径——酶裂解和去甲基化过程, 只有前者会释放等摩尔量的 DMS, 故 DMS/DMSP 可以间接地反映出培养液中 DMSP 降解生成 DMS 的能力, 该比值可以粗略地估算实验过程中 DMSP 以酶裂解途径降解所占的比例。培养过程中, I—IV 组 DMS/DMSP 值均在 10% 以内, 说明只有一小部分的 DMSP 通过酶裂解作用分解生成 DMS。已有研究表明, DMS 只是 DMSP 降解生成的一个副产物, 通常只占 5%—10%, 而 75% 左右的 DMSP 通过去甲基化作用生成 AA 和甲硫醇(Ledyard *et al.*, 1996; Van Duyl *et al.*, 1998; Kiene *et al.*, 2000)。本文中 DMS/DMSP 值在 5% 左右, 与该研究结果一致。由于 DMSP 的两种主要降解途径都会生成 AA, 故百分比 AA/(AA+DMSP) 可以间接地反映出藻液中 DMSP 降解生成 DMS 和 AA 的能力, 该比值可以粗略地估算实验过程中 DMSP 的表观降解的百分数。I—IV 组 AA/(AA+DMSP) 的变化范围分别为 16.5%—45.0%、9.8%—46.0%、11.3%—40.0% 和 14.1%—52.0%, 平均值分别为 29.1%、29.4%、27.9% 和 36.4%。该比值在 25°C 时该比值明显高于 20°C 下培养的 3 组, 这说明温度升高可以促进 DMSP 的降解。总体上, 4 个条件下 DMSP 的表观降解比例均低于 40%。

以 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为添加氮源时, 在培养周期内海水中 DMS/DMSP 比值变化范围分别为 2.2%—3.1% 和 2.1%—3.0%, 平均值分别为 2.6% 和 2.5%, 两组外加氮源的培养液中 DMS/DMSP 比值均高于 2%, 而未添加任何氮源的对照组只有 1.7%。这说明仍然只有一小部分 DMSP 通过酶裂解释放 DMS, 且添加无机氮会促进 DMSP 的降解。Webb 等(2015)在微藻赫氏圆石藻培养过程中测得该值在培养前 20 天低于 2%, 而之后高值可达到 6%, 平均值在 4% 左右, 该值略高于本实验的结果值, 这主要是藻体之间的差异造成的。表观降解比 AA/(AA+DMSP) 分别为 16.4%—29.3% 和 14.5%—33.0%, 均大于对照组的 11.2%。两种氮源添加方式下 DMSP 的表观降解能力相近, 且随着添加浓度的增大而增大, 但 DMSP 的表观降解比例不超过 40%。

4 结论

(1) 浒苔对温度和盐度具有较强的适应能力, 在温度为 $20\text{—}25^\circ\text{C}$ 、盐度为 25—35 的范围内, 表现出基本一致的生长趋势。

(2) 在实验条件下, 培养体系中盐度的升高会使浒苔吸收硫酸盐同化生成并释放更多的 DMSP; 培养体系释放 DMS 量在 $S=30$, $T=20^\circ\text{C}$ 时达到最大值, 而在 $S=25$, $T=20^\circ\text{C}$ 时出现最小值。

(3) 添加 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的浒苔的平均增长速率大于添加同浓度的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浒苔, 即 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 更容易被浒苔吸收利用, 对浒苔的生长影响更为明显。对于两种形态无机氮, 随着添加无机氮浓度的增加, DMS 的释放量增加, 而 DMSP 一直维持在一个较高的水平。

(4) 两组实验中 DMS/DMSP 的值在 10% 以内变化, 表明酶裂解途径只占 DMSP 降解的一小部分。总体上, 代表 DMSP 表观降解比的 AA/(AA+DMSP) 的值低于 40%。

参 考 文 献

- 王 婷, 石晓勇, 张传松等, 2011. 2008 年黄海浒苔绿潮暴发区营养盐浓度变化及分布特征. 海洋通报, 30(5): 578—582
- 王阳阳, 霍元子, 田千桃等, 2011. 浒苔对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{PO}_4\text{-P}$ 吸收动力学特征. 上海海洋大学学报, 20(1): 121—125
- 田千桃, 霍元子, 王阳阳等, 2010. 浒苔对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 吸收的相互作用. 海洋科学, 34(7): 41—45
- 刘春颖, 王莉莉, 杨桂朋等, 2013. 海水中丙烯酸的高效液相色谱法建立及应用. 海洋学报, 35(1): 172—176.
- 李 靖, 李星云, 敖新宇等, 2012. 剑湖湿地水生植物金鱼藻与茭草对环境氮素的响应. 贵州农业科学, 40(4): 143—145
- 李瑞香, 吴晓文, 韦钦胜等, 2009. 不同营养盐条件下浒苔的生长. 海洋科学进展, 27(2): 211—216
- 杨桂朋, 景伟文, 陆小兰, 2004. 海洋中 DMSP 的研究进展. 中国海洋大学学报(自然科学版), 34(5): 854—860
- 汪文俊, 王飞久, 陈松林等, 2008. 浒苔 ITS 区的扩增和分析. 海洋水产研究, 29(5): 124—129
- 姚 雪, 2011. 浒苔种群世代研究与大型海洋藻类基因序列分析. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文
- Charlier R H, Morand P, Finkl C W *et al.*, 2007. Green tides on the Brittany coasts. Environmental Research, Engineering and Management, 3(41): 52—59
- Charlson R J, Lovelock J E, Andreae M O *et al.*, 1987. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. Nature, 326(6114): 655—661
- Dortch Q, 1990. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. Marine Ecology Progress Series, 61: 183—201

- Flynn K J, 1991. Algal carbon-nitrogen metabolism: a biochemical basis for modelling the interactions between nitrate and ammonium uptake. *Journal of Plankton Research*, 13(2): 373—387
- Guillard R R L, Ryther J H, 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* hustedt, and *detonula confervacea* (cleve) gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2): 229—239
- Karsten U, Kück K, Vogt C *et al*, 1996. Dimethylsulfoniopropionate production in phototrophic organisms and its physiological functions as a cryoprotectant. In: Kiene R P, Visscher P T, Keller M D *et al* eds. *Biological and Environmental Chemistry of DMSP and Related Sulfonium Compounds*. Boston, MA: Springer, 143—153
- Kiene R P, Linn L J, 2000. Distribution and turnover of dissolved DMSP and its relationship with bacterial production and dimethylsulfide in the Gulf of Mexico. *Limnology and Oceanography*, 45(4): 849—861
- Lana A, Bell T G, Simó R *et al*, 2011. An updated climatology of surface dimethylsulfide concentrations and emission fluxes in the global ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 25(1): GB1004
- Ledyard K M, Dacey J W H, 1996. Microbial cycling of DMSP and DMS in coastal and oligotrophic seawater. *Limnology and Oceanography*, 41(1): 33—40
- Liu D Y, Keesing J K, Dong Z J *et al*, 2010. Recurrence of the world's largest green-tide in 2009 in Yellow Sea, China: *Porphyra yezoensis* aquaculture rafts confirmed as nursery for macroalgal blooms. *Marine Pollution Bulletin*, 60(9): 1423—1432
- Luo M B, Liu F, 2011. Salinity-induced oxidative stress and regulation of antioxidant defense system in the marine macroalga *Ulva prolifera*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 409(1—2): 223—228
- Nguyen B C, Mihalopoulos N, Putaud J P *et al*, 1992. Covariations in oceanic dimethyl sulfide, its oxidation products and rain acidity at Amsterdam Island in the Southern Indian Ocean. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 15(1): 39—53
- Spielmeyer A, Pohnert G, 2012. Daytime, growth phase and nitrate availability dependent variations of dimethylsulfoniopropionate in batch cultures of the diatom *Skeletonema marinoi*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 413: 121—130
- Stefels J, 2000. Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *Journal of Sea Research*, 43(3—4): 183—197
- Steinke M, Kirst G O, 1996. Enzymatic cleavage of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in cell-free extracts of the marine macroalga *Enteromorpha clathrata* (Roth) Grev. (Ulvales, Chlorophyta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 201(1—2): 73—85
- Sunda W G, Hardison R, Kiene R P *et al*, 2007. The effect of nitrogen limitation on cellular DMSP and DMS release in marine phytoplankton: climate feedback implications. *Aquatic Sciences*, 69(3): 341—351
- Sunda W, Kieber D J, Kiene R P *et al*, 2002. An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature*, 418(6895): 317—320
- Van Alstyne K L, Pelletreau K N, Rosario K, 2005. The effects of salinity on dimethylsulfoniopropionate production in the green alga *Ulva fenestrata* Postels et Ruprecht (Chlorophyta). *Botanica Marina*, 46(4): 350—356
- Van Alstyne K L, Wolfe G V, Freidenburg T L *et al*, 2001. Activated defense systems in marine macroalgae: evidence for an ecological role for DMSP cleavage. *Marine Ecology Progress Series*, 213: 53—65
- Van Duyl F C, Gieskes W W C, Kop A J *et al*, 1998. Biological control of short-term variations in the concentration of DMSP and DMS during a *Phaeocystis* spring bloom. *Journal of Sea Research*, 40(3—4): 221—231
- Webb A L, Malin G, Hopkins F E *et al*, 2015. Ocean acidification has different effects on the production of dimethylsulfide and dimethylsulfoniopropionate measured in cultures of *Emiliania huxleyi* and a mesocosm study: a comparison of laboratory monocultures and community interactions. *Environmental Chemistry*, 13(2): 314—329
- Yang G P, Jing W W, Kang Z Q *et al*, 2008. Spatial variations of dimethylsulfide and dimethylsulfoniopropionate in the surface microlayer and in the subsurface waters of the South China Sea during springtime. *Marine Environmental Research*, 65(1): 85—97
- Ye N H, Zhang X W, Mao Y Z *et al*, 2011. 'Green tides' are overwhelming the coastline of our blue planet: taking the world's largest example. *Ecological Research*, 26(3): 477—485
- Yoch D C, Ansede J H, Rabinowitz K S, 1997. Evidence for intracellular and extracellular dimethylsulfoniopropionate (DMSP) lyases and DMSP uptake sites in two species of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8): 3182—3188
- Zhang H H, Yang G P, Zhu T, 2008. Distribution and cycling of dimethylsulfide (DMS) and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the sea-surface microlayer of the Yellow Sea, China, in spring. *Continental Shelf Research*, 28(17): 2417—2427

INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON GROWTH OF *ULVA PROLIFERA* AND ITS BIOGENIC SULFUR RELEASE

TAN Ting-Ting^{1,3}, LIU Chun-Ying^{1,3}, LIU Tao², XU Gao-Bin¹,
ZHANG Lei², DENG Xue^{1,3}, LU Xiao-Lan^{1,3}

(1. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Qingdao 266100, China; 2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China)

Abstract Outbreak of green tides in recent years in the Yellow Sea caused a negative impact on the local marine environment. As the major inductive algae of the green bloom, *Ulva prolifera* is a responsible alga for releasing dimethylsulfide (DMS), which plays an important role in the biogenic sulfur transfer, sulphate absorption, and sulfur cycles in seawater. In a laboratory culture, we studied the effects of temperature, salinity, and nitrogen nutrient on the growth of *U. prolifera* and its biogenic sulfur production. In different experiment conditions (salinity: 25—35, temperature: 20—25°C), salinity was not the main factor affecting the growth of *U. prolifera*. However, with the increase of salinity, the concentration of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) increased and maximized at the condition of 20°C and salinity 35. The temperature increase promoted the growth of *U. prolifera*, and the wet weight of *U. prolifera* increased about 25% at 25°C compared with 20°C on Day 5. In addition, DMS concentration in the culture medium was about 20nmol/L, which is approximately 4 times of the control, while DMSP was even decoupled. Therefore, the addition of nitrogen nutrition could promote *U. prolifera* growth and the releases of DMS and other compounds. Meanwhile, NH_4^+ was found easier to be assimilated than NO_3^- . The DMS and DMSP were about 60% and 30% higher in the nitrogen nutrient-enriched groups than that of the blank. The ratio of DMS/DMSP was lower than 10% and the ratio of AA/(AA+DMSP)—the percentage of DMSP apparent degradation—was below 40%.

Key words *Ulva prolifera*; growth; environmental factors; dimethylsulfide (DMS); dimethylsulfoniopropionate (DMSP)