

利用稳定同位素(^{15}N)示踪技术研究浮游藻类 氮素吸收速率特征*

韩菲尔^{1,2} 赵中华² 李大鹏¹ 张 路²

(1. 苏州科技大学环境科学与工程学院 苏州 215009; 2. 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室 南京 210008)

摘要 浮游藻类对溶解态氮的吸收同化是湖泊氮生物循环和水体富营养化发生机制探讨的关键环节。本文通过 ^{15}N 稳定同位素添加实验以铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、海链藻(*Thalassiosira* sp.)、卡德藻(*Tetraselmis* sp.)、剧毒卡尔藻(*Karlodinium veneficum*)以及盐水隐藻(*Rhodomonas salina*)为研究对象,从浮游藻类氮素吸收时间、营养盐基质以及藻种差异三个方面研究五种藻类对铵氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、硝氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)、尿素氮(Urea-N)三种形态氮的吸收特征。研究发现:(1)浮游藻类对三种形态氮的吸收均在 1h 时吸收速率最高,其氮素吸收过程为快速吸收。(2)浮游藻类优先吸收还原态氮,其中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 吸收速率最高,当培养周期为 1d 和 4d 时浮游藻类对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 吸收速率的均值分别为 4.05 和 4.15 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$;浮游藻类对 Urea-N 吸收相对偏好系数为 25.18—713.42,表现出对小分子溶解态有机氮的特定偏好性。(3)不同藻种对氮素吸收具有不同特征,其中,剧毒卡尔藻对三种形态氮的吸收速率均为最高,而铜绿微囊藻的吸收速率均为最低;不同藻种不同培养时间氮素吸收速率差异与浮游藻类生长周期等特性有关。不同浮游藻类对不同形态氮素表现出吸收特异性,对水体氮负荷和浮游藻类水华优势种形成将产生重要影响。

关键词 氮吸收; ^{15}N 同位素; 相对偏好系数; 氮形态; 浮游藻类

中图分类号 Q178 **doi:** 10.11693/hyh20181200289

近年来,全球湖泊、海洋水环境氮污染已经成为一个极其严峻的问题。研究人员普遍认为农业生产过程中大量含氮农药的使用以及污水处理厂着重于除磷而忽略氮的行为(Wang *et al.*, 2009)是导致自然水体氮含量升高的主要原因。水体中过高的氮负荷导致水质不断恶化,进而引起水体富营养化、水华等环境问题,严重危害了水生生物多样性和生态系统健康(Dodds *et al.*, 2016; Schindler *et al.*, 2016)。水体中各种形态氮之间的固氮、氨化、硝化、反硝化等作用均是氮循环系统中的重要环节,而通过浮游藻类吸收转化溶解态氮,是形成湖泊中有机氮的关键环节。浮游

藻类氮吸收过程分为两个步骤:第一步为吸收,其中,铵氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)、硝氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)、尿素氮(Urea-N)分别通过铵根转运蛋白(ammonium transporters, AMTs)、硝酸根转运蛋白(nitrate transporters, NRTs)、尿素转运蛋白(urea transporters, URTs)进入细胞中;第二步为同化,同化的过程较吸收而言更为复杂。进入浮游藻类细胞内的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 在硝酸还原酶的作用下还原为亚硝氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$), $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 又在硝酸还原酶的作用下进一步还原为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (Glibert *et al.*, 2006)。Urea-N 的同化有两种途径,一是通过脲酶作用将 Urea-N 转化为

* 国家自然科学基金项目,41771519 号,41671477 号;研究所一三五规划重点培育项目“湖泊复合污染的生态效应与防控治理”,NIGLAS2018GH05 号。韩菲尔,硕士研究生, E-mail: feier_han0916@163.com

通信作者: 张 路,研究员, E-mail: luzhang@niglas.ac.cn

收稿日期: 2018-12-08, 收修改稿日期: 2019-02-22

NH_4^+ -N 和无机碳, 二是通过腺嘌呤核苷三磷酸(ATP): 尿素氨基水解酶将 Urea-N 转化为 NH_4^+ -N 和无机碳 (Solomon *et al*, 2010)。细胞直接吸收和 NO_3^- -N、Urea-N 转化而来的 NH_4^+ -N 在谷氨酰氨合成酶和谷氨酸合成酶的一系列反应下最终合成氨基酸进而合成蛋白质被细胞所利用。由于不同浮游藻类细胞内氮素转运蛋白及同化酶活性不同, 因此具有不同的氮素吸收特征。过去的研究主要集中于单一藻类对不同形态氮素的吸收代谢过程研究, 缺乏对不同藻类氮素吸收代谢的对比研究(Cochlan *et al*, 2008; Mulholland *et al*, 2018)。

目前对氮素吸收过程的研究主要集中于吸收动力学, 其中温度、光照强度、pH 以及底物浓度被认为是影响氮素吸收过程的主要因素(Weisse *et al*, 2016; Mactavish *et al*, 2017; Paparazzo *et al*, 2017)。Paparazzo 等(2017)在 San Jorge 海湾的研究发现光照、营养物(硝酸盐、亚硝酸盐、氨氮、磷酸、硅酸)、温度会改变细胞内色素, 叶绿素与硝氮吸收正相关。现有研究表明铵态氮、尿素态氮、氨基酸等还原态氮在浮游藻类生长过程中起到非常重要的作用, 但大部分研究仍然集中于对无机氮的研究, 仅有少部分研究对浮游藻类尿素吸收进行了探讨(Paparazzo *et al*, 2017; Tank *et al*, 2018; Tripathy *et al*, 2018)。虽然尿素在水生生态系统中的浓度非常低, 但它对浮游藻类氮吸收的贡献却超过了 50%(Kang *et al*, 2017), 同时也是再生氮的主要来源, 是浮游藻类营养的主要基质。由于受农药使用以及水产养殖等的影响, 尿素在水体中的浓度逐渐增高, 越来越多的有害藻华被认为与尿素的人为富集有关(Glibert *et al*, 2016)。

人类活动会改变水体的营养负荷, 进而改变水体中氮素营养盐的主要形态。已有研究表明, 当水环境中氮元素以铵态氮、尿素态氮、氨基酸等还原态氮形式存在时, 蓝藻和绿藻易于生长成为淡水和海洋生态系统中的优势种; 而当水体氮素主要以硝态氮形式存在时, 硅藻则表现出较高的生长能力, 成为优势藻种(Donald *et al*, 2013; Glibert *et al*, 2014b)。因此, 氮素形态化学计量学变化即不同形态氮素含量组成特征对浮游藻类群落组成和结构具有重要的影响, 在水华优势种形成和维持过程中发挥关键作用, 开展水体浮游藻类氮素吸收的研究对于探讨水体氮循环和富营养化发生机制具有重要的环境意义。

近年来稳定氮同位素示踪技术在氮素吸收速率

研究中是一种被普遍使用的有力方法, 逐渐取代了凯氏定氮法、通过测定环境氮素浓度变化或测定叶绿素变化等常用的间接方法。该方法由 Dugdale 等(1967)于 1967 年首次建立用于测定浮游藻类对新氮源和再生氮源的吸收率, 目前该方法在无机氮、尿素以及氨基酸吸收方面发展较为成熟, 可用于原位测定浮游藻类氮素吸收速率, 且测定结果相较于间接方法更为准确。稳定氮同位素法通过向体系中添加 ^{15}N 同位素, 通过对 ^{15}N 的示踪, 测定浮游藻类吸收后颗粒氮中 ^{15}N 丰度, 进而计算氮素吸收速率。

硅藻海链藻(*Thalassiosira* sp.)、绿藻卡德藻(*Tetraselmis* sp.)、鞭毛藻剧毒卡尔藻(*Karlodinium veneficum*)、隐藻盐水隐藻(*Rhodomonas salina*)以及蓝藻铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)均是海洋赤潮优势藻种(Semcheski *et al*, 2016), 同时, 铜绿微囊藻也是淡水水华优势藻种(Adolf *et al*, 2008)。研究显示, 剧毒卡尔藻与铜绿微囊藻是湾口富营养化主要的有毒藻类(Lin *et al*, 2018)。剧毒卡尔藻由于其对鱼类毒性而受到广泛关注, Chesapeake Bay 海湾鱼死亡以及牡蛎等的产卵水平下降被证实与剧毒卡尔藻的毒性有关(Deeds *et al*, 2006; Glibert *et al*, 2007), 报道显示在南非、欧洲、澳大利亚西部以及美国东部沿海地区的河口系统中曾暴发过剧毒卡尔藻水华(Adolf *et al*, 2009; Place *et al*, 2012)。剧毒卡尔藻是一种兼性营养藻, 能够通过吞噬作用利用盐水隐藻作为营养源(Glibert *et al*, 2014a), 同时盐水隐藻的存在会使得绿藻生长更为快速。铜绿微囊藻由于其会产生微胱氨酸及其他毒素(Wang *et al*, 2013), 大量耗氧从而导致鱼类死亡。同时, 铜绿微囊藻已是湖泊、水库等淡水生态系统水华主要优势种(de Figueiredo *et al*, 2004; Paerl *et al*, 2013), 会严重危害湖泊、水库生态系统健康和安全。

不同湖泊、海洋水体氮素营养盐化学计量学不同, 不同藻种对不同形态氮的偏好性也不同。当环境中营养盐化学计量学发生改变, 浮游藻类群落结构也会随之发生变化。目前化学计量学研究的重点多集中于氮磷比对浮游植物生长及优势种形成的影响(Vrede *et al*, 2009), 然而氮素污染的加重以及氮素形态变化对浮游植物的生长效应影响研究表明, 氮素形态变化以及氮素内循环作用在浮游植物生长竞争和优势种形成方面同样存在重要作用(Mousseau *et al*, 2001; Heil *et al*, 2007)。所以, 通过分析对不同浮游藻类氮素吸收速率差异性可以有效探究浮游藻类对氮素营

养盐化学计量学变化的响应。针对这一目的, 本研究选择海链藻、卡德藻、剧毒卡尔藻、盐水隐藻以及铜绿微囊藻为研究对象, 通过室内培养, 通过稳定同位素(^{15}N)示踪技术探究不同浮游藻类氮素吸收特征, 丰富水体氮素循环和富营养化发生理论机制。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

稳定氮同位素($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ 、 $^{15}\text{Urea}$)由美国马里兰大学环境科学中心(University of Maryland Center for Environmental Science, UMCES) Horn Point Laboratory 实验室提供。

1.2 生物材料

海链藻、卡德藻、剧毒卡尔藻以及盐水隐藻由 UMCES Horn Point Laboratory 实验室藻种培育库提供, 铜绿微囊藻由中国科学院淡水藻种库提供。

1.3 氮吸收实验

稳定同位素添加实验如图 1 所示。海链藻、卡德藻、剧毒卡尔藻以及盐水隐藻采用 f/2 培养基、铜绿微囊藻采用 BG-11 培养基于实验室纯化培养, 设置光照强度为 $430\mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$, 光照周期为 12h : 12h, 温度为 25°C 。培养后海链藻、卡德藻、剧毒卡尔藻、盐水隐藻接种至美国马里兰州 Choptank River 过滤后的按照 f/2 培养液进行营养加富的淡水(调节培养液盐度为 12)中进行室内培养, 铜绿微囊藻接种至按照 BG-11 培养基进行营养加富的淡海水中进行室内培养, 分别于培养 1d 和 4d 时进行氮素吸收实验。氮素吸收实验操作如下: 分别取培养 1d 和 4d 时的藻悬液 10mL 于 27 根 15mL 离心管中, 添加相应的氮底物 ^{15}N 稳定同位素使离心管中 ^{15}N 浓度为 $25\mu\text{mol}/\text{L}$, 添加每种形态氮的离心管为 9 根, 设置 3 组吸收时间为 1h, 3 组为 6h, 3 组为 24h, 维持原培养条件, 吸收结束后立即将藻悬液过 GF/F 膜终止反应并严格记录添加稳定同位素与终止反应时间。收集滤膜冷冻保存, 滤膜经 40°C 烘箱干燥后, 送样用于同位素质谱仪进行稳定氮同位素比值测定。吸收实验前取 20mL 藻悬液过 GF/F 膜, 滤膜经 40°C 烘箱干燥, 送样用于碳氮(C/N)元素分析仪进行颗粒态氮测定, 收集滤液冷冻保存用于 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 $\text{Urea}-\text{N}$ 营养盐含量指标测定。颗粒态氮含量以及氮同位素的分析测定均在美国马里兰大学环境科学中心分析测试中心完成。 NH_4^+-N 测定采用纳氏分光光度法, NO_3^--N 测定采用酒石酸钾钠分光光度法, $\text{Urea}-\text{N}$ 测定采用二乙酰-一肟分光光度法。

氮素吸收率的计算参照 Dugdale 等(1967)以及 Glibert 等(1982)修正的公式:

$$V = \frac{(\delta^{15}\text{N}_{\text{样品}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{本底}})}{U \times t} \times \text{PN}, \quad (1)$$

$$U = \frac{c_a}{c + c_a}, \quad (2)$$

式中, V 为氮素吸收速率 [$\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$]; $\delta^{15}\text{N}_{\text{样品}}$ 为 GF/F 膜上颗粒态样品的 ^{15}N 丰度; $\delta^{15}\text{N}_{\text{本底}}$ 为 ^{15}N 的天然丰度(0.366%); PN 为 GF/F 膜上颗粒态氮含量 ($\mu\text{mol}/\text{L}$); c_a 为培养体系中添加的 ^{15}N 浓度; c 为培养体系中溶解态氮浓度; t 为培养时间(h)。

其中, 稳定氮同位素由 MAT-251 型同位素质谱仪分析完成。测定结果以 $\delta^{15}\text{N}$ 丰度表示:

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \left[\left(\frac{R_{\text{样品}}}{R_{\text{标准}}} \right) - 1 \right] \times 1000, \quad (3)$$

$$R = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}, \quad (4)$$

式中, ${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ 是样品和标准品(大气中的氮气)的氮同位素比率, 也即样品和标准品所产生 N_2 中 30/28 的绝对同位素比。

相对偏好系数(RPI)根据下式计算:

$$\text{RPI} \left(\frac{\text{NH}_4^+-\text{N}}{\text{DN}} \right) = \frac{\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})}{\rho(\text{DN})} \left/ \frac{[\text{NH}_4^+-\text{N}]}{[\text{DN}]} \right., \quad (5)$$

式中, $\rho(\text{NH}_4^+-\text{N})$ 为浮游藻类群落对 NH_4^+-N 的绝对吸收速率, $\rho(\text{DN})$ 为浮游藻类群落对 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 $\text{Urea}-\text{N}$ 绝对吸收速率之和。 $[\text{NH}_4^+-\text{N}]$ 为培养介质中 NH_4^+-N 的浓度, $[\text{DN}]$ 为培养介质中 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 $\text{Urea}-\text{N}$ 浓度之和。RPI($\text{NO}_3^--\text{N}/\text{DN}$)、RPI($\text{Urea}-\text{N}/\text{DN}$)计算公式与 RPI($\text{NH}_4^+-\text{N}/\text{DN}$)类似。

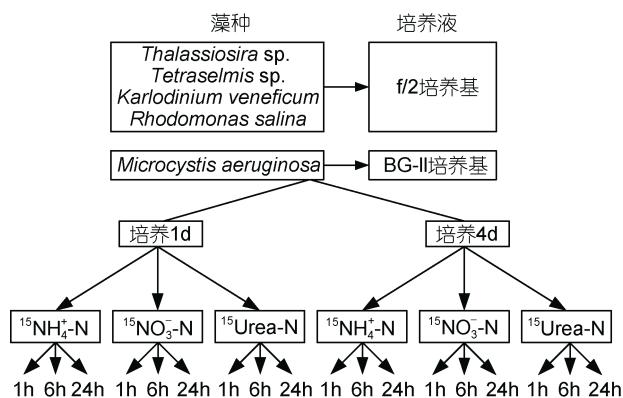


图 1 稳定同位素示踪实验示意图

Fig.1 The schematic map of the enrichment experiment

2 结果与讨论

2.1 氮素吸收速率随时间变化特征

如图 2 所示, 浮游藻类氮吸收速率随吸收时间变化表现出明显差异。培养时间为 1d 和 4d 的两组实验中, 吸收 1h 时 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收速率均值最高[1d/4d, 均值 $\pm$ 标准偏差: $(8.90\pm 6.31)/(9.09\pm 8.52)\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$], 吸收 24h 时最低 $[(0.73\pm 0.40)/(0.79\pm 0.45)\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})]$, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收速率随吸收时间变化表现为 $1\text{h}>6\text{h}>24\text{h}$ 。培养时间为 1d 和 4d 时, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的吸收速率均值同样在吸收 1h 时最高 $[(1.65\pm 0.86)/(2.14\pm 1.18)\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})]$; 培养 1d 时, 吸收 24h 的吸收速率均值最低 $[(0.21\pm 0.08)\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})]$, 表现为 $1\text{h}>6\text{h}>24\text{h}$; 培养 4d 时, 吸收时间为 6h $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的吸收速率均值最低 $[(0.32\pm 0.20)\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})]$, 表现为 $1\text{h}>24\text{h}>6\text{h}$ 。培养时间为 1d 和 4d 的两组实验中, Urea-N 的吸收速率均值也在吸收 1h 时最高 $[(1.64\pm 0.69)/(1.78\pm 1.82)\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})]$, 吸收 24h 时最低 $[(0.41\pm 0.20)/(0.38\pm 0.35)\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})]$, 吸收速率随吸收时间的变化也表现为 $1\text{h}>6\text{h}>24\text{h}$ 。

经过 1d 和 4d 的培养后, 浮游藻类对三种形态氮的吸收速率表现出相同的趋势, 吸收速率随着时间的延长逐渐减小并趋于平缓。吸收 1h 的吸收速率显著高于吸收 6h ($P<0.01$) 和吸收 24h ($P<0.01$), 吸收 6h 与吸收 24h 之间不存在显著差异 ($P>0.05$)。

吸收时间为 1h 时, 培养介质中营养盐充足, 三种形态氮的吸收速率均处于较高水平。浮游藻类快速吸收各形态氮, 培养介质中的氮浓度快速下降, 当吸收到达 6h 时, 由于培养介质中基质浓度处于低水平, 氮吸收速率相对于 1h 有明显的下降, 且由于 6h 之后营养盐浓度始终处于较低水平, 24h 与 6h 的平均吸收速率相差不大。培养 4d 时, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 吸收 24h 的吸收速率高于 6h, 这可能是由于 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的大量减少, 降低了其对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 吸收的抑制作用, 另外, 由于 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与 Urea-N 的吸收速率均处于较低水平, 为满足浮游藻类生长所需, 也有可能使 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 吸收速率有所增加。

根据图 2 结果可认为浮游藻类氮素吸收是一个快速吸收的过程, 这与已有的文献研究结果相同。Glibert 等(1981)在美国马萨诸塞州对海洋藻的实验表明, 前 2h 为快速吸收, 2h 后吸收达到稳定。同样地, Kanda 等(1985)对太平洋自然藻种群落的氮吸收研究显示, 当吸收超过 3h, 吸收过程不受基质影响变为线

性吸收, 即吸收达到平衡。浮游藻类氮素吸收无论藻种、基质差异均为快速吸收, 根据文献及相关实验可以认为吸收时间为 2h 时, 吸收达到稳定。因此, 在后续的氮素吸收实验中可选择 2h 为吸收时间, 一定程度上减短实验时间并保证吸收速率的准确性。

2.2 不同形态氮的吸收特征

不同形态氮的吸收速率如图 3 所示。当培养时间为 1d 和 4d 时, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收速率均值均为最高, 分别为 4.05 和 $4.15\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 与 Urea-N 的平均吸收速率均值大致相同, 培养 1d 时分别为 0.74 和 $0.95\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 培养 4d 时分别为 1.06 和 $1.02\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收速率显著高于另外两种形态的氮 ($P<0.01$), $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 与 Urea-N 吸收速率无明显差异 ($P>0.05$)。

有研究发现, 相对偏好系数(RPI)可以表征浮游藻类对不同形态氮底物的偏好性(McCarthy *et al.*, 1977)。当 RPI 值 >1 时表明浮游藻类对该种氮源具有特定偏好性, 反之则表明其对该种氮源偏好性较低。

不同藻种的 RPI 值如图 4 所示, 5 种藻对 Urea-N 的偏好系数都远高于另外两种形态的氮, 最高的是铜绿微囊藻, 为 713.42, 最低的是剧毒卡尔藻, 为 25.18。对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的相对偏好系数虽然比 Urea-N 的小, 但仍大于 1, 最高的是铜绿微囊藻, 为 18.92, 最低的是盐水隐藻, 为 1.10, 而对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的相对偏好系数最高的是盐水隐藻, 为 0.27, 最低的是卡德藻, 为 0.13。浮游藻类对 Urea-N 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的 RPI 值均大于 1, 则说明浮游藻类对 Urea-N 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 具有特定偏好性, 而 $\text{RPI}(\text{NO}_3^-\text{-N}/\text{DN})<1$, 浮游藻类对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 这种氮源的偏好性较低。

从浮游藻类的氮吸收速率来看, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的吸收速率远高于其他两种形态, Urea-N 的吸收速率与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 无明显差异。而从相对偏好系数来看, 浮游藻类对 Urea-N 的相对偏好系数最高, 其次为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 。相对偏好系数与实际吸收速率结果产生差异的主要原因是培养介质中 Urea-N 的浓度为 0.05— $0.32\mu\text{mol}/\text{L}$, 远小于培养介质中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的浓度(2.63— $34.08\mu\text{mol}/\text{L}$)与 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浓度(6.82— $203.85\mu\text{mol}/\text{L}$)。Urea-N 的低浓度抑制了浮游藻类对其的吸收, 从而导致了 Urea-N 相对偏好系数与吸收速率不对等的情况。由图 2 和图 3 可知, 相对于氧化态氮, 浮游藻类优先利用还原态氮, 这可能是由于浮游藻类细胞吸

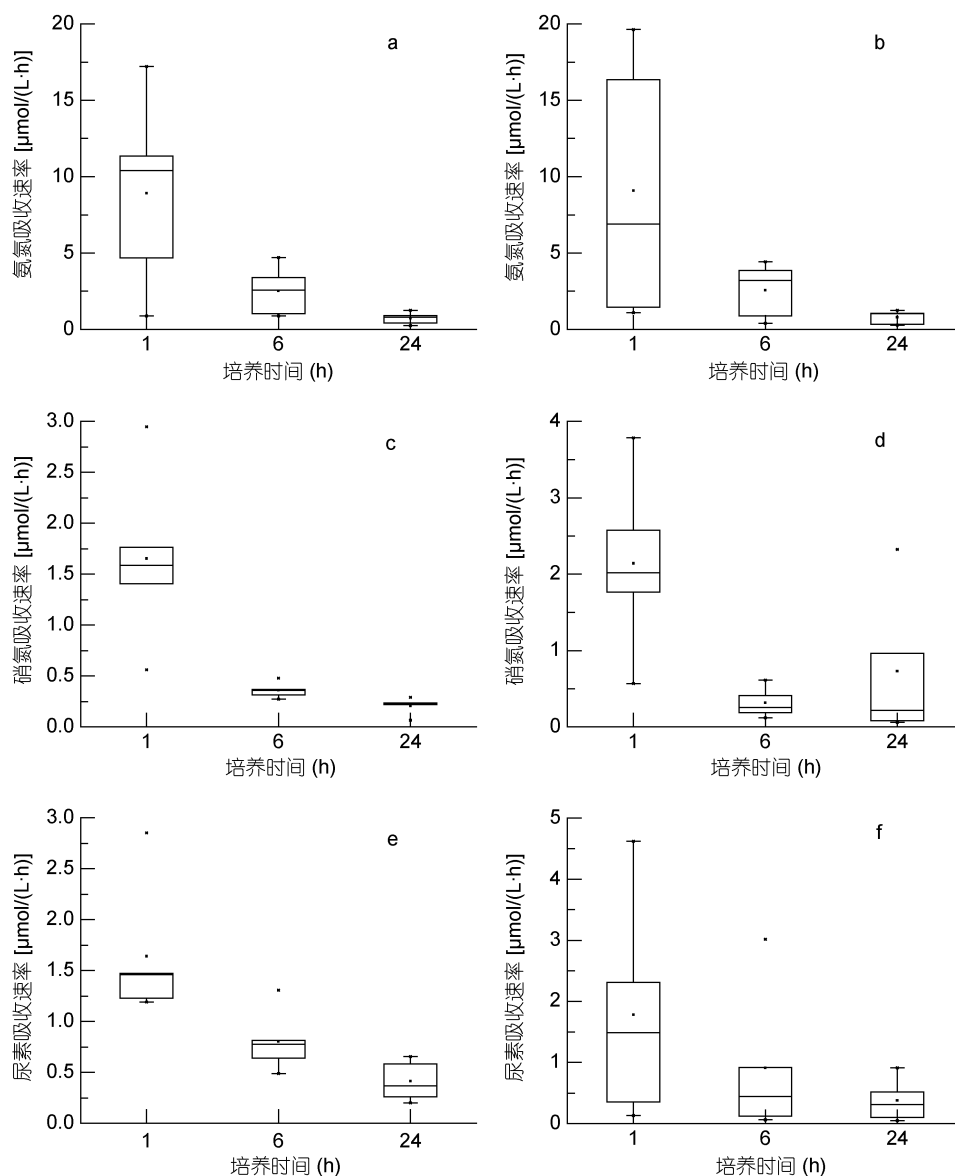


图2 不同吸收时间浮游藻类氮吸收速率

Fig.2 The nitrogen uptake rate of phytoplankton at different times

注: a、c、e 为海链藻、卡德藻、剧毒卡尔藻、盐水隐藻以及铜绿微囊藻五种藻分别纯培养 1d 后测定不同吸收时间时的吸收速率; b、d、f 为五种藻分别纯培养 4d 后测定不同吸收时间时的吸收速率

收与同化 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 首先需要通过铵根转运蛋白将其转运进入细胞中, 然后在谷氨酰氨合成酶的转氮作用下将铵根转化为氨基酸进而合成蛋白质。而 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 通过硝酸转运蛋白进入细胞后还需通过硝酸还原酶以及亚硝酸还原酶还原为铵根后才可进行后续的反应。而将 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 需要消耗 8 个电子 (Glibert *et al*, 2016)。此外, 由于环境中 Urea-N 的含量较低, 因此 Urea-N 主要通过主动运输的方式进入浮游藻类细胞中。在浮游藻类细胞内, 在脲酶的作用下, Urea-N 被转化为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和无机碳。脲酶是一种胞

浆酶, 催化 Urea-N 水解成 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和氨基甲酸盐。氨基甲酸盐自发分解产生 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 H_2CO_3 。Urea-N 的另一种降解方式是通过 ATP: 尿素氨基水解酶的作用, 这一过程可以是尿素羧化酶和脲基甲酸水解酶的各自作用也可以是共同作用, 尿素羧化酶降解尿素这一过程仅需要 1 个 ATP。浮游藻类吸收 Urea-N 和所需要的能量非常少 (Solomon *et al*, 2010)。因此, 浮游藻类优先吸收还原态的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、Urea-N 等氮源。此外, Bronk 等 (2014) 的实验结果均表现出浮游藻类对还原态氮的偏好性^[34]。

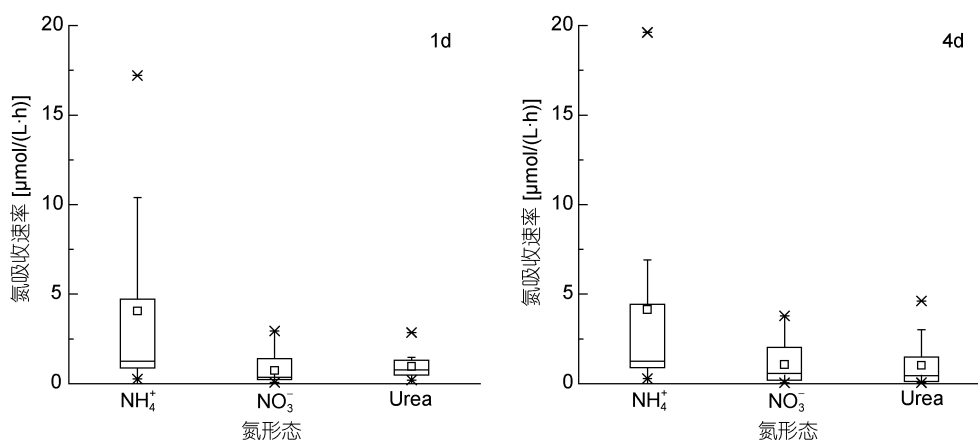


图3 不同形态氮的吸收速率

Fig.3 The uptake rate of nitrogen in different forms

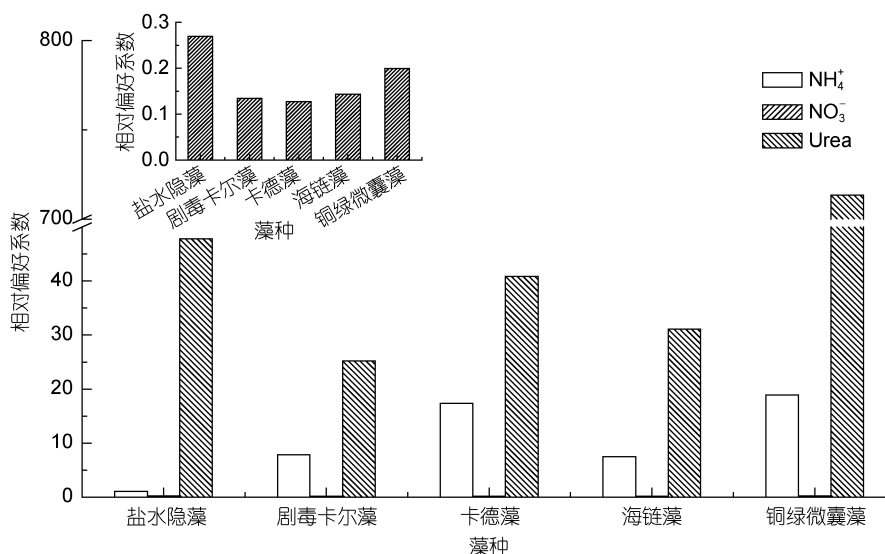


图4 不同藻种的氮吸收相对偏好系数

Fig.4 The relative preference index of different phytoplankton for different nitrogen forms

有研究表明,某些有毒、有害浮游藻类对尿素的利用率远远大于 NO_3^- -N 等无机形态的氮(Baer *et al.*, 2015)。另外,当水体中检测到高浓度的尿素后,许多有害浮游藻类如微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)细胞数目出现快速增长。因此,有害藻类暴发次数增加与人为源尿素的增加存在一定关联(Glibert *et al.*, 2006)。之前普遍认为富营养化湖泊主要为无机氮限制或磷限制,而浮游藻类对尿素的高偏好性则表明,湖泊富营养化可能受尿素限制。水体中尿素来源主要分为人为富集与自然富集。人为源主要包括农业地表径流和淋溶地下水、生活污水和工业废水排放、大气沉降。1828 年弗里德里希·维勒通过氰酸银与铵反应

生成尿素,这一发现导致工业生产的尿素达到 7000 万吨/年,过去 40 年尿素使用量已增长为原来的 100 倍,大量使用尿素导致水体中尿素含量大量升高。同时,有研究表明,氮素的迁移转化过程、释放分解过程也对水体尿素水平有很大的影响(韩晓霞等, 2014),普遍认为水体内部尿素的主要来源有沉积物或水体中有机物的缺氧或厌氧降解产生、细菌分解有机物过程中释放、浮游动物和鱼等直接排泄以及紫外光分解有机物等(Siuda *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2010; Bogard *et al.*, 2012)水体缺氧或低氧环境会导致水体大量内源尿素的累积。Mulholland 等(2018)在 Chesapeake Bay 的研究表明,尽管 Urea-N 的浓度很

低且在整个培养过程中不稳定, 但 Urea-N 对总氮吸收的贡献率依然很高, 甚至有时超过 50%。当环境中尿素含量不断增加, Urea-N 对总氮吸收的贡献率将显著提高, 浮游藻类水华发生将更加频繁。因此, 如何有效控制水环境中 Urea-N 浓度将成为控制浮游藻类水华发生的关键环节。

2.3 不同藻种氮吸收特征

2.3.1 不同藻种对相同形态氮的吸收速率差异

如图 5 所示, 不同藻种对各形态氮的吸收速率(按藻密度归一化后的吸收速率)表现出显著的差异。总氮(TN)吸收速率即 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 以及 Urea-N 吸收速率之和表现为剧毒卡尔藻的吸收速率均值最高 $[(11.36 \pm 12.55) \times 10^{-8} \mu\text{mol}/(\text{cell} \cdot \text{h})]$, 铜绿微囊藻最低 $[(0.06 \pm 0.10) \times 10^{-8} \mu\text{mol}/(\text{cell} \cdot \text{h})]$, 整体表现为剧毒卡尔藻 > 盐水隐藻 > 卡德藻 > 海链藻 > 铜绿微囊藻, 五种藻之间均不存在显著差异。剧毒卡尔藻的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 吸收速率均值最高 $[(8.96 \pm 9.91) \times 10^{-8} \mu\text{mol}/(\text{cell} \cdot \text{h})]$, 铜绿微囊藻的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 吸收速率均值最低 $[(0.04 \pm 0.06)$

$\times 10^{-8} \mu\text{mol}/(\text{cell} \cdot \text{h})]$, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 吸收情况表现为剧毒卡尔藻 > 卡德藻 > 盐水隐藻 > 海链藻 > 铜绿微囊藻, 其中盐水隐藻与铜绿微囊藻之间 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 吸收速率有显著差异 ($P < 0.05$), 而其他藻种之间不存在显著差异。剧毒卡尔藻的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 吸收速率均值仍为最高 $[(1.40 \pm 1.59) \times 10^{-8} \mu\text{mol}/(\text{cell} \cdot \text{h})]$, 铜绿微囊藻的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 吸收速率均值仍为最低 $[(0.13 \pm 0.19) \times 10^{-7} \mu\text{mol}/(\text{cell} \cdot \text{h})]$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 吸收情况同样表现为剧毒卡尔藻 > 盐水隐藻 > 卡德藻 > 海链藻 > 铜绿微囊藻, 五种藻之间仍不存在显著差异。剧毒卡尔藻与盐水隐藻的 Urea-N 吸收速率均值相当, 分别为 $(0.99 \pm 1.17) \times 10^{-8}$ 和 $(0.94 \pm 0.68) \times 10^{-8} \mu\text{mol}/(\text{cell} \cdot \text{h})$, 而铜绿微囊藻的最低 $[(0.13 \pm 0.17) \times 10^{-7} \mu\text{mol}/(\text{cell} \cdot \text{h})]$, Urea-N 吸收速率表现为剧毒卡尔藻 > 盐水隐藻 > 卡德藻 > 海链藻 > 铜绿微囊藻, 五种藻之间依然不存在显著差异 ($P > 0.05$)。海链藻与铜绿微囊藻对于各种形态氮的吸收速率都低于其他几种藻, 剧毒卡尔藻对于 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的吸收速率都远高于其他几种藻。

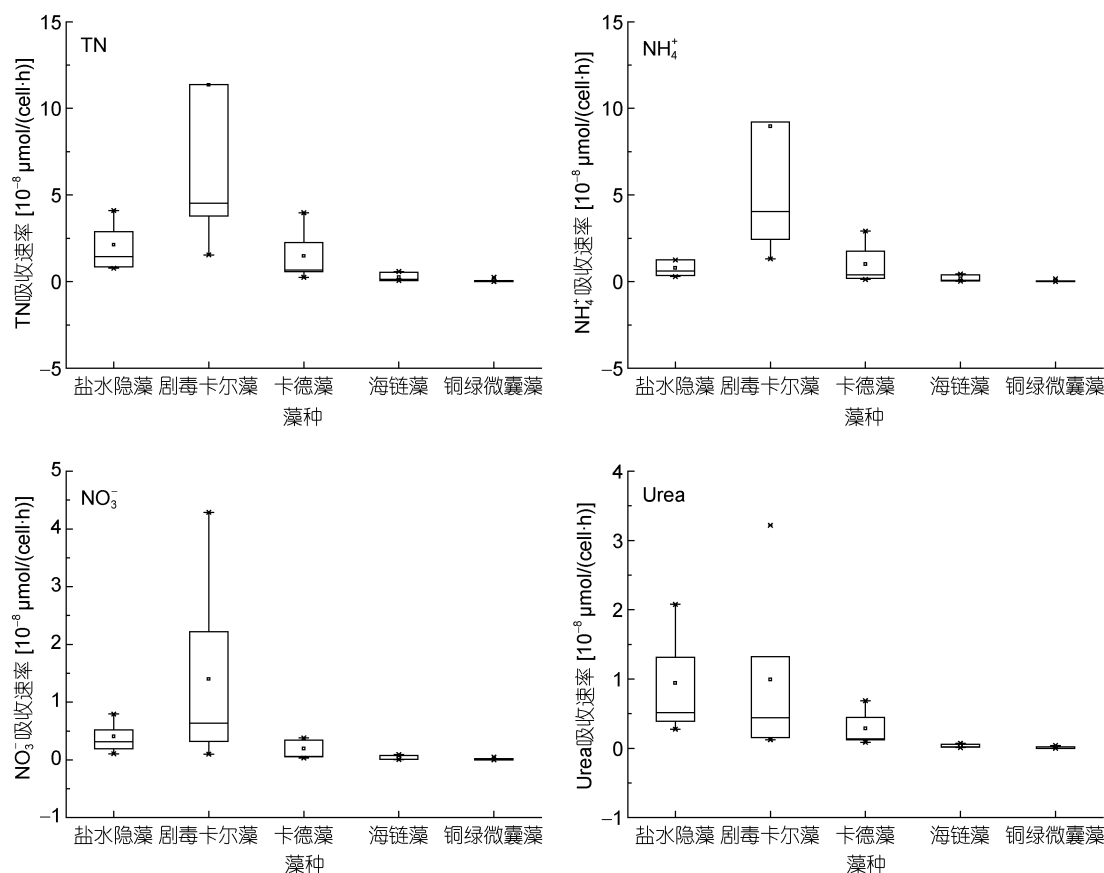


图 5 不同形态氮各藻种间差异

Fig.5 Differences in the relationship between nitrogen form and algae species

注: TN: 总氮=铵氮+硝氮+尿素氮

浮游藻类对氮源的吸收大都具有选择性。在氧化态氮源(如 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N)充足的情况下,浮游藻类仍然偏向利用还原态的氮源(NH_4^+ -N 和 Urea-N)(Bronk *et al.*, 2014),这与本文的结论相一致。然而不同藻种对氮源的吸收也存在差异性,虽然绝大多数浮游藻类能够利用 NH_4^+ -N 和 Urea-N,但有研究表明部分硅藻在 Urea-N 作为唯一氮源时不能继续生长,更偏向于使用 NO_3^- -N (Kang *et al.*, 2017),从而导致硅藻的 NO_3^- -N 吸收速率高于其 Urea-N 吸收速率,这与本文海链藻的吸收特征相似。然而鞭毛类(包括甲藻)浮游藻类以及蓝藻等相比其他氮源更喜欢利用还原形态的 NH_4^+ -N (Donald *et al.*, 2013; Glibert *et al.*, 2014b),这可能与浮游藻类细胞的个体差异有关。

2.3.2 同一藻种不同培养时间氮素吸收速率差异将浮游藻类氮素吸收速率按藻密度归一化后由图 6 可知,培养时间为 1d 时,盐水隐藻以 Urea-N 吸收为主,其他 4 种藻均以 NH_4^+ -N 吸收为主,培养时间为 4d 时,铜绿微囊藻由以 NH_4^+ -N 吸收为主逐渐转变为以 NO_3^- -N 吸收为主,而其他藻种不变。当培养时间分别为 1d 和 4d 时,铜绿微囊藻氮素吸收速率显著下降, Urea-N 吸收速率几乎为 0。海链藻 NH_4^+ -N 和 Urea-N 吸收速率下降, NO_3^- -N 吸收速率却有所升高。盐水隐藻三种形态氮素吸收速率均明显下降,但仍以 Urea-N 吸收为主。培养时间为 4d 时,卡德藻三种形态氮吸收速率均相较于培养时间为 1d 时升高。剧毒卡尔藻与盐水隐藻三种形态氮的吸收速率表现出与铜绿微囊藻相似规律,均随培养时间增长而降低。

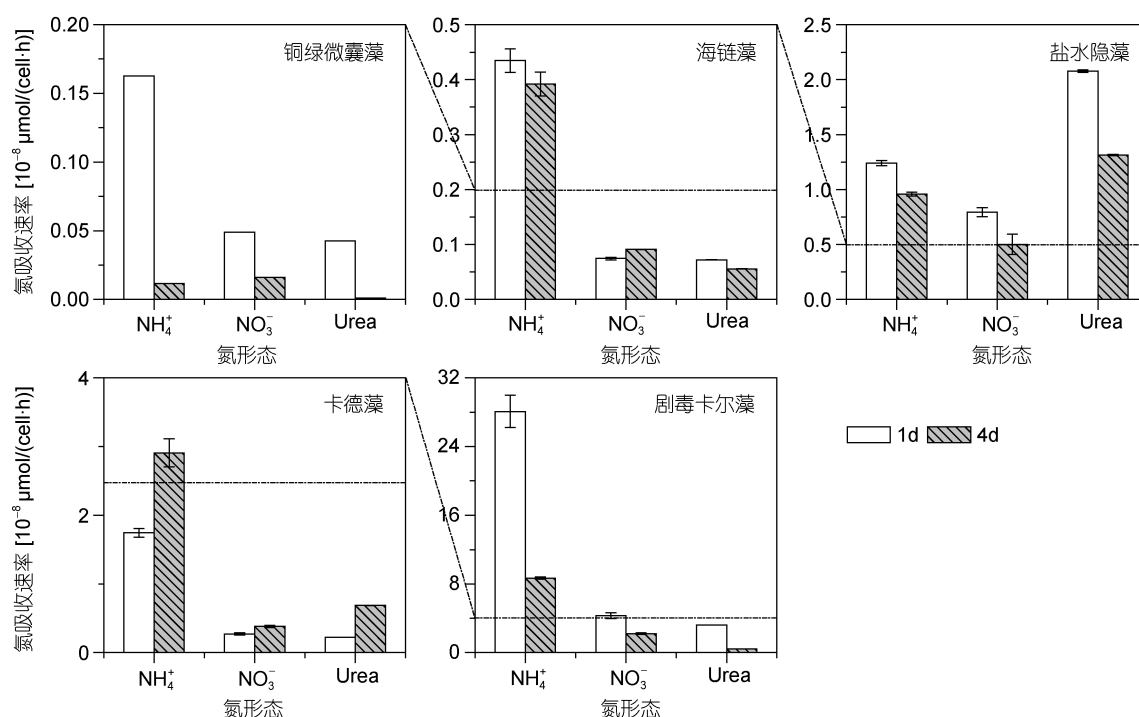


图 6 不同藻种的氮吸收特性

Fig.6 Characteristics of nitrogen uptake of different algae species

浮游藻类生长周期是造成其氮吸收生长速率变化的一个关键因素。当浮游藻类处于对数生长期时,其生长速率最快,生长所需能量最多,其氮吸收速率也会达到最高。刘金鑫等(2017)将蓝藻(*Microcystis aeruginosa*)的生长期划分为 0—3d 为延缓期,4d 进入指数生长期,4d 生长速率应高于 1d,其生长所需的营养物质更多,氮吸收速率则应更快,这与我们所得的结论有所偏差,考虑是由于铜绿微囊藻培养前期消

耗了大量的营养盐,4d 时营养盐浓度较低,限制了其对氮素的吸收。海链藻在 1—4d 处于指数生长期,维持在一个较高的生长速率水平,而 4d 后进入稳定期,生长基本停止(魏鹏骥等,2018),因此,其 1d 与 4d 时的氮吸收速率变化并不明显。当浮游藻类处于指数生长期时,对于营养盐的高需求导致其对氮素吸收速率处于较高水平,可以通过控制营养盐的输入,使得浮游藻类对氮素的利用最小化。

天然水体中, 由于人类活动例如农业、工业活动很大程度上改变了水体中营养盐化学计量学, 因此导致暴发不同类型的水华。N:P 化学计量变化会对浮游藻类生长和水华优势种形成造成影响, 当水环境中 N:P 降低, 浮游藻类优势种会转变为固氮蓝藻(Vrede *et al.*, 2009)。同时氮素形态的变化也会影响浮游藻类生长和水华优势种形成, 当 NO_3^- -N 浓度较高的水体, 硅藻为优势藻种, 而 NH_4^+ -N 含量较高的水体中, 鞭毛藻以及蓝藻成为了优势藻种(Mousseau *et al.*, 2001; Heil *et al.*, 2007)。本论文研究也同样发现对于海洋或者湖泊等水体, 氮素形态变化及不同形态氮素化学计量比例对于赤潮或者水华优势种的形成具有一定的影响, 通过氮素吸收速率变化以及后续的代谢过程差异影响浮游植物的生长和竞争, 最后作用于水生态系统浮游植物群落结构。因此, 开展生态化学计量学研究尤其是氮素形态化学计量特征研究, 明确水体营养盐化学计量特征对水华优势种形成的影响效应, 是开展水域生态系统富营养化发生机制探讨和污染防治的重要理论基础。

3 结论

(1) 浮游藻类对氮的吸收在 1h 左右吸收速率最快, 为快速吸收, 当吸收时间延长, 氮吸收速率会随浓度下降而减小。

(2) 浮游藻类以 NH_4^+ -N 吸收为主, 相对偏好系数表明浮游藻类对 Urea-N 偏好性最高, 对 NO_3^- -N 偏好性最低。

(3) 不同浮游藻类的氮素吸收速率差异明显。剧毒卡尔藻对三种形态氮的吸收速率均为最高, 铜绿微囊藻对三种形态氮素的吸收速率均最低。

参 考 文 献

- 刘金鑫, 谢邵文, 杨 芬等, 2017. 不同生长期和磷浓度下砷酸盐对铜绿微囊藻生长及砷吸收的影响. 环境科学学报, 37(6): 2061—2068
- 韩晓霞, 朱广伟, 许 海等, 2014. 太湖夏季水体中尿素的来源探析. 环境科学, 35(7): 2547—2556
- 魏鹏骥, 姜璐璐, 2018. Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 与 Zn^{2+} 对威氏海链藻生长生理和油脂积累的影响. 中国海洋大学学报, 48(7): 47—54
- Adolf J E, Bachvaroff T, Place A R, 2008. Can cryptophyte abundance trigger toxic *Karlodinium veneficum* blooms in eutrophic estuaries? Harmful Algae, 8(1): 119—128
- Adolf J E, Bachvaroff T R, Place A R, 2009. Environmental modulation of karlotoxin levels in strains of the cosmopolitan dinoflagellate, *Karlodinium veneficum* (Dinophyceae). Journal of Phycology, 45(1): 176—192
- Baer S E, Connelly T L, Bronk D A, 2015. Nitrogen uptake dynamics in landfast sea ice of the Chukchi Sea. Polar Biology, 38(6): 781—797
- Bogard M J, Donald D B, Finlay K *et al.*, 2012. Distribution and regulation of urea in lakes of central North America. Freshwater Biology, 57(6): 1277—1292
- Bronk D A, Killberg-Thoreson L, Sipler R E *et al.*, 2014. Nitrogen uptake and regeneration (ammonium regeneration, nitrification and photoproduction) in waters of the West Florida Shelf prone to blooms of *Karenia brevis*. Harmful Algae, 38: 50—62
- Cochlan W P, Herndon J, Kudela R M, 2008. Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). Harmful Algae, 8(1): 111—118
- de Figueiredo D R, Azeiteiro U M, Esteves S M *et al.*, 2004. Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. Ecotoxicology and Environmental Safety, 59(2): 151—163
- Deeds J R, Reimschuessel R, Place A R, 2006. Histopathological effects in fish exposed to the toxins from *Karlodinium micrum*. Journal of Aquatic Animal Health, 18(2): 136—148
- Dodds W K, Smith V H, 2016. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in streams. Inland Waters, 6(2): 155—164
- Donald D B, Bogard M J, Finlay K *et al.*, 2013. Phytoplankton-specific response to enrichment of phosphorus-rich surface waters with ammonium, nitrate, and urea. PLoS One, 8(1): e53277
- Dugdale R C, Goering J J, 1967. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. Limnology and Oceanography, 12(2): 196—206
- Glibert P M, Alexander J, Meritt D W *et al.*, 2007. Harmful algae pose additional challenges for oyster restoration: impacts of the harmful algae *Karlodinium veneficum* and *Prorocentrum minimum* on early life stages of the oysters *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis*. Journal of Shellfish Research, 26(4): 919—925
- Glibert P M, Goldman J C, 1981. Rapid ammonium uptake by marine phytoplankton. Marine Biology Letters, 2: 25—31
- Glibert P M, Harrison J, Heil C *et al.*, 2006. Escalating worldwide use of urea – a global change contributing to coastal eutrophication. Biogeochemistry, 77(3): 441—463
- Glibert P M, Hinkle D C, Sturgis B *et al.*, 2014a. Eutrophication of a maryland/virginia coastal lagoon: a tipping point, ecosystem changes, and potential causes. Estuaries and Coasts, 37(S1): 128—146
- Glibert P M, Lipschultz F, McCarthy J J *et al.*, 1982. Isotope dilution models of uptake and remineralization of ammonium by marine plankton. Limnology and Oceanography, 27(4): 639—650
- Glibert P M, Wilkerson F P, Dugdale R C *et al.*, 2014b. Phytoplankton communities from San Francisco Bay Delta respond differently to oxidized and reduced nitrogen substrates—even under conditions that would otherwise

- suggest nitrogen sufficiency. *Frontiers in Marine Science*, 1: 17
- Glibert P M, Wilkerson F P, Dugdale R C *et al*, 2016. Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions. *Limnology and Oceanography*, 61(1): 165—197
- Heil C A, Revilla M, Glibert P M *et al*, 2007. Nutrient quality drives differential phytoplankton community composition on the southwest Florida Shelf. *Limnology and Oceanography*, 52(3): 1067—1078
- Kanda J, Saino T, Hattori A, 1985. Nitrogen uptake by natural populations of phytoplankton and primary production in the Pacific Ocean: regional variability of uptake capacity. *Limnology and Oceanography*, 30(5): 987—999
- Kang Y, Kudela R M, Gobler C J, 2017. Quantifying nitrogen assimilation rates of individual phytoplankton species and plankton groups during harmful algal blooms via sorting flow cytometry. *Limnology and Oceanography: Methods*, 15(8): 706—721
- Lin C H, Lyubchich V, Glibert P M, 2018. Time series models of decadal trends in the harmful algal species *Karlodinium veneticum* in Chesapeake Bay. *Harmful Algae*, 73: 110—118
- MacTavish R M, Cohen R A, 2017. Water column ammonium concentration and salinity influence nitrogen uptake and growth of *Spartina alterniflora*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 488: 52—59
- McCarthy J J, Taylor W R, Taft J L, 1977. Nitrogenous nutrition of the plankton in the Chesapeake Bay. 1. Nutrient availability and phytoplankton preferences. *Limnology and Oceanography*, 22(6): 996—1011
- Mousseau L, Klein B, Legendre L *et al*, 2001. Assessing the trophic pathways that dominate planktonic food webs: an approach based on simple ecological ratios. *Journal of Plankton Research*, 23(8): 765—777
- Mulholland M R, Morse R, Egerton T *et al*, 2018. Blooms of dinoflagellate mixotrophs in a lower Chesapeake Bay tributary: carbon and nitrogen uptake over diurnal, seasonal, and interannual timescales. *Estuaries and Coasts*, 41(6): 1744—1765
- Paerl H W, Otten T G, 2013. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial Ecology*, 65(4): 995—1010
- Paparazzo F E, Williams G N, Pisoni J P *et al*, 2017. Linking phytoplankton nitrogen uptake, macronutrients and chlorophyll-*a* in SW Atlantic waters: the case of the Gulf of San Jorge, Argentina. *Journal of Marine Systems*, 172: 43—50
- Place A R, Bowers H A, Bachvaroff T R *et al*, 2012. *Karlodinium veneticum*—the little dinoflagellate with a big bite. *Harmful Algae*, 14: 179—195
- Schindler D W, Carpenter S R, Chapra S C *et al*, 2016. Reducing phosphorus to curb lake eutrophication is a success. *Environmental Science & Technology*, 50(17): 8923—8929
- Semcheski M R, Egerton T A, Marshall H G, 2016. Composition and diversity of intertidal microphytobenthos and phytoplankton in Chesapeake Bay. *Wetlands*, 36(3): 483—496
- Siuda W, Chróst R J, 2006. Urea and ureolytic activity in lakes of different trophic status. *Polish Journal of Microbiology*, 55(3): 221—225
- Solomon C M, Collier J L, Berg G M *et al*, 2010. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review. *Aquatic Microbial Ecology*, 59(1): 67—88
- Tank J L, Martí E, Riis T *et al*, 2018. Partitioning assimilatory nitrogen uptake in streams: an analysis of stable isotope tracer additions across continents. *Ecological Monographs*, 88(1): 120—138
- Tripathy S C, Patra S, Vardhan K V *et al*, 2018. Nitrogen uptake by phytoplankton in surface waters of the Indian sector of Southern Ocean during austral summer. *Frontiers of earth science*, 12(1): 52—62
- Vrede T, Ballantyne A, Mille-Lindblom C *et al*, 2009. Effects of N:P loading ratios on phytoplankton community composition, primary production and N fixation in a eutrophic lake. *Freshwater Biology*, 54(2): 331—344
- Wang H J, Wang H Z, 2009. Mitigation of lake eutrophication: loosen nitrogen control and focus on phosphorus abatement. *Progress in Natural Science*, 19(10): 1445—1451
- Wang X Y, Sun M J, Xie M J *et al*, 2013. Differences in microcystin production and genotype composition among *Microcystis* colonies of different sizes in Lake Taihu. *Water Research*, 47(15): 5659—5669
- Weisse T, Gröschl B, Bergkemper V, 2016. Phytoplankton response to short-term temperature and nutrient changes. *Limnologia*, 59: 78—89

THE USE OF ^{15}N TO MEASURE NITROGEN UPTAKE OF PHYTOPLANKTON

HAN Fei-Er^{1,2}, ZHAO Zhong-Hua², LI Da-Peng¹, ZHANG Lu²

(1. School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China;

2. State Key Laboratory of Lake Science and Environment Research, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract The uptake of dissolved nitrogen by phytoplankton is a key link in the mechanism of lake nitrogen biocirculation and eutrophication. Characteristics of nitrogen uptake by *Microcystis aeruginosa*, *Thalassiosira* sp., *Tetraselmis* sp., *Karlodinium veneticum* and *Rhodomonas salina* were studied in three parts: the time of nitrogen uptake by phytoplankton, nitrate forms and the difference of algae species. The uptake of three forms of nitrogen: $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ and Urea-N, was studied by using ^{15}N isotope addition experiments. The uptake of three nitrogen forms by planktonic algae was the highest at 1h, and the nitrogen uptake was rapid. Phytoplankton preferentially uptakes the reduced nitrogen, such as ammonia. When the incubation time of algae is 1d and 4d, the mean uptake rate of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ is $4.05\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ and $4.15\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, respectively; The relative preference index of phytoplankton to Urea-N is 25.18—713.42, which shows the specific preference for micro-molecule dissolved organic nitrogen. Different species of algae have different characteristics for nitrogen uptake. The uptake rate of $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$, and Urea-N by *Karlodinium veneticum* is the highest, while the *Microcystis aeruginosa* is the lowest. Different algae species have different nitrogen uptake rates when the incubation time is different, which is related to the characteristic growth cycle of planktonic algae. Different planktonic algae exhibit uptake specificity for different forms of nitrogen, and play an important role in the nitrogen load of water and the formation of dominant species of planktonic algae.

Key words Nitrogen uptake; ^{15}N isotope; relative preference index; nutrient substrate; phytoplankton species