

# 球形棕囊藻对不同氮源的吸收利用机制\*

蒙蕊<sup>1, 2, 3</sup> 宋秀贤<sup>1, 2, 3</sup> 刘淑雅<sup>1, 2, 3</sup> 姜文彬<sup>1, 2, 3</sup> 俞志明<sup>1, 2, 3</sup>

(1. 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室(中国科学院海洋研究所) 青岛 266071; 2. 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; 3. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要** 本文以球形棕囊藻为实验材料, 从营养盐利用及生理生化角度研究了不同氮源对其生长的影响。研究表明: 球形棕囊藻以尿素为氮源的藻密度以及叶绿素 *a* 浓度均高于以  $\text{NH}_4\text{Cl}$  或  $\text{NaNO}_3$  为氮源的藻密度以及叶绿素 *a* 浓度; 硝酸盐还原酶(NR)及脲酶(urease)活性表达受培养基中氮源浓度及吸收速率调控, 硝酸盐还原酶在以  $\text{NaNO}_3$  为氮源条件下活性最高, 脲酶在以尿素为氮源条件下活性表达最强; 通过比较不同条件下硝酸盐还原酶活性及脲酶活性, 发现脲酶活性远高于硝酸盐还原酶活性, 这可能是以尿素为氮源条件下球形棕囊藻藻密度更高的主要原因。研究还发现, 氮饥饿状态的球形棕囊藻对  $\text{NH}_4^+$  具有很高的初始吸收速率, 8h 左右将  $\text{NH}_4^+$  快速吸收耗尽, 在随后的实验期间保持着较低且平稳的比生长速率, 可见球形棕囊藻能快速吸收氨氮并储存在细胞内, 当培养液中氮源耗尽后用于维持细胞的生长。

**关键词** 球形棕囊藻; 氮源; 硝酸盐还原酶; 脲酶

中图分类号 X173 doi: 10.11693/hyh20180100003

氮是海洋微藻生长所必需的重要生源要素, 是浮游植物细胞蛋白质、酶、核酸、磷酸、叶绿素等的基本组成元素。海洋环境中氮具有多种形式, 可分为无机氮及有机氮, 主要无机氮包括  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N, 有机氮包括溶解性有机氮及颗粒态有机氮, 其中尿素及各种氨基酸等为重要的溶解性有机氮 (Ryther *et al.*, 1971; Lobban *et al.*, 1994)。研究表明, 不同海洋微藻对不同氮源的吸收利用及其响应机制存在较大差异。例如: 蓝藻在尿素作为单一氮源条件下生长良好 (Berman *et al.*, 1999), 原绿球藻的一些株系不能利用  $\text{NO}_3^-$ -N 维系其生长 (Moore *et al.*, 2002)。胡章喜等 (2010) 的研究结果显示, 赤潮异弯藻、凯伦藻、球形棕囊藻和角毛藻虽然都能有效利用无机氮  $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 进行生长, 但均更偏好于  $\text{NO}_3^-$ -N。海洋微藻对不同氮源的吸收利用能力是影响海洋中浮游植物的分布及组成的重要影响因素 (Dyhrman *et al.*, 2003), 亦即不同海域各种氮源含量、组成的差异也会影响着海域

浮游植物的群落结构和组成。因此, 研究浮游植物对不同氮源的吸收利用机制具有重要的科学意义。

球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa*) 是海洋中分布最为广泛的浮游植物之一, 是一种广温广盐的藻类, 在南北极及热带的海洋中均有分布 (Smith *et al.*, 1991), 其具有复杂的异性生活史, 具有群体和游离单细胞两种不同的生活形态 (沈萍萍等, 2000)。近年来, 球形棕囊藻在我国邻近海域多次暴发藻华, 导致大量养殖鱼类死亡 (李波等, 2015; Liu *et al.*, 2010), 甚至危害核电安全。氮源作为海洋微藻生长所必需的生源要素, 研究球形棕囊藻对氮源的吸收利用对解释球形棕囊藻藻华的暴发具有重要的科学意义。本文选取球形棕囊藻单细胞作为实验藻种, 研究了分别以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  及尿素为氮源条件下, 球形棕囊藻生长、营养盐利用及相关酶的活性, 从多种角度上分析球形棕囊藻对不同氮源的吸收利用机制, 研究结果可为球形棕囊藻赤潮的预测及防治工作提供理论基础。

\* 国家重点研发计划, 2017YFC1404300 号; 鳌山科技创新计划项目“近海生态灾害发生机理与防控策略”, 2016ASKJ02-3 号; 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山人才计划资助, 2017ASTCP-OS16 号。蒙蕊, 硕士研究生, E-mail: mengrui0101@163.com

通讯作者: 宋秀贤, 研究员, 博士生导师, E-mail: songxx@qdio.ac.cn

收稿日期: 2018-01-05, 收修改稿日期: 2018-03-23

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本文所用藻种为球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa*), 由本实验室藻种室提供。培养实验所用的海水为经 0.45 $\mu\text{m}$  混合纤维膜过滤后于 121 $^{\circ}\text{C}$  灭菌 30min 的天然海水。藻种在 f/2 培养基 (Guillard *et al.*, 1962), 温度 (18 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ , 光照度 5000lx, 光暗比 L:D = 12:12 的条件下培养至指数生长期后用于实验。

### 1.2 实验方法

取指数生长期的球形棕囊藻液, 以 1:20 的比例使用过滤灭菌后的天然海水进行稀释, 而后进行饥饿培养, 使其在饥饿培养结束后的藻密度达到  $5.0 \times 10^5$  cells/mL。将藻液分为四组: 对照组、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  以及尿素添加组。考虑现场环境氮源的实际浓度以及保证藻细胞快速生长, 实验选择添加后培养基中  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  及尿素浓度均为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

在处于氮饥饿状态的藻细胞培养基中分别添加氮源为  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  及尿素的 f/2 培养基, 对照组添加不含氮源的 f/2 培养基。将添加完营养液作为实验开始时刻, 分别在 0、2、4、8、24、28、32、48h 8 个时间点取样, 用于测定各参数。各组实验均设置三组平行。

### 1.3 各参数的测定方法

**1.3.1 培养基中氮浓度的测定** 在各时间点分别取 100mL 藻液, 使用 GF/F 膜过滤分离, 加入一滴  $\text{CHCl}_3$  固定后于 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存, 样品中  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 及  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度采用 SKALAR 全自动营养盐分析仪 (Skalar Ltd, Netherland) 进行分析测定; 尿素浓度参照 (GB/T 18204.29-2000), 采用二乙酰一肟—安替比林分光光度法进行测定。

**1.3.2 藻密度** 使用血球计数板和奥林巴斯倒置相差显微镜 (Olympus CKX53) 计数不同时间点的藻密度, 并采用实验室荧光仪 (Turner Designs Trilogy) 测定活体荧光值, 根据计数及荧光数据进行线性拟合后得到藻密度。

**1.3.3 叶绿素 a** 取一定体积的藻液经 25mm GF/F 膜过滤分离, 向滤膜中加入 90% 的丙酮后 4 $^{\circ}\text{C}$  黑暗萃取 24h, 使用美国 Turner Designs 公司 Trilogy 实验室多功能荧光仪进行测定。

**1.3.4 可溶性蛋白** 采用考马斯亮蓝 G-250 法 (王学奎, 2006) 测定。称取 100mg 考马斯亮蓝 G-250 溶解于 50mL 95% 乙醇中, 加入 100mL 85% (w/v) 的磷酸,

用水定容至 1000mL, 过滤后即成为考马斯亮蓝 G-250 反应液。向离心收集的藻细胞中加入 1mL 0.1mol/L 的磷酸缓冲溶液后, 冰浴下超声破碎 2min, 离心后取 100 $\mu\text{L}$  提取液并加入 500 $\mu\text{L}$  反应液, 放置 5min 后使用酶标仪 (EnSight Multimode Plate Reader, PerkinElmer) 在 595nm 波长下比色测定。测定的吸光值与使用牛血清蛋白绘制的标准曲线比对后, 得到藻细胞中可溶性蛋白浓度。

**1.3.5 硝酸盐还原酶活性** 参照 Berges 等 (1995) 的研究报道, 通过测定反应产物  $\text{NO}_2^-$  浓度换算得到硝酸盐还原酶的活性。样品离心后贮存于液氮中, 加入 500 $\mu\text{L}$  的提取液于冰浴下超声破碎 2min, 再次离心后向两个 5mL 的离心管中各加入 200 $\mu\text{L}$  的酶提取液, 100 $\mu\text{L}$  黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 溶液, 100 $\mu\text{L}$  还原型辅酶 (NADH) 溶液及 200 $\mu\text{L}$  磷酸缓冲液, 加入 200 $\mu\text{L}$   $\text{KNO}_3$  使反应开始。向其中一只离心管立刻加入 2mL 醋酸锌终止液, 作为反应时间为 0 时刻的参照, 另一支离心管于培养箱中培养 45min 加入 2mL 醋酸锌终止液。反应终止后在 4000g 下离心 10min, 并加入 20 $\mu\text{L}$  吩嗪硫酸甲酯 (PMS) 溶液。最后通过奈乙二胺分光光度法测定亚硝酸盐浓度。

**1.3.6 脲酶活性** 通过靛酚蓝分光光度法检测反应产物中  $\text{NH}_4^+$  的浓度得到。样品离心后贮存于液氮中, 加入 600 $\mu\text{L}$  磷酸盐提取液 (pH=7.0), 冰浴超声破碎 2min, 离心后分别向两支 2mL 的离心管中加入 200 $\mu\text{L}$  的提取液、750 $\mu\text{L}$  200mmol/L 的磷酸缓冲溶液、50 $\mu\text{L}$  的尿素开始反应, 立即将其中一只离心管置于 100 $^{\circ}\text{C}$  水浴 5min 使酶失活, 作为反应时间为 0 时刻的参照。另一只在 25 $^{\circ}\text{C}$  下反应两个半小时后在 100 $^{\circ}\text{C}$  下水浴 5min 使酶失活。最后通过靛酚蓝分光光度法测定反应液中铵盐浓度。

### 1.4 数据处理

比生长速率 ( $\mu$ ) 的计算公式为:

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

式中,  $N$  为细胞密度,  $t$  为时间, 本文中取的时间间隔为 1 天。

采用 SPSS20.0 和 Origin9.0 对数据进行统计分析 与图表绘制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同氮源对球形棕囊藻生长的影响

首先考察了经过氮饥饿处理后的球形棕囊藻在

三种氮源条件下的生长情况(图 1)。从图中可以看出,在氮源初始浓度为  $50\mu\text{mol/L}$  的条件下,三种氮源均能有效促进球形棕囊藻快速生长。结果显示,实验期间处于氮饥饿状态的对照组藻细胞密度保持在初始密度  $5.4\times 10^5\text{cells/mL}$  基本不变,三个实验组藻细胞密度在实验开始后的前 24h 增长缓慢,  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  及尿素添加组 24h 时细胞密度从起始密度  $5.4\times 10^5\text{cells/mL}$  分别增加至  $7.49\times 10^5$ 、 $8.57\times 10^5$ 、 $8.65\times 10^5\text{cells/mL}$ , 比生长速率分别为 0.30、0.45 和 0.44/d (表 1)。实验组藻细胞在 24—48h 快速分裂生长, 48h 时  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和尿素添加组的藻细胞密度分别达到  $1.58\times 10^6$ 、 $1.37\times 10^6$  和  $2.09\times 10^6\text{cells/mL}$ , 比生长速率分别为 0.75、0.47 和 0.89/d (表 1)。单位体积的叶绿素 *a* 浓度与藻细胞密度呈现相同的变化趋势, 回归分析显示两者呈现出显著线性相关 ( $P<0.01$ ,  $R^2>0.9$ )。

从上述结果可见,处于氮饥饿状态的球形棕囊藻添加  $\text{NaNO}_3$  或尿素后 24h 内的比生长速率仅为 48h 的一半左右,说明前 24h 吸收的氮源并不能立即用于快速分裂生长中,而  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加组 24h 和 48h 的生长速率基本不变,且 24h 时的生长速率高于另外两组实验组,这说明藻细胞吸收的  $\text{NH}_4^+$  可能被立即用于其自身的分裂生长中。产生这种结果的原因与浮游植物对不同氮源的吸收利用方式相关,浮游植物吸收的  $\text{NH}_4^+$  可直接在谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合成酶(GS/GAGOT)酶的作用下合成氨基酸,而所吸收的  $\text{NO}_3^-$  则需经过硝酸盐还原酶(NR)、亚硝酸盐还原酶(NiR)还原成  $\text{NH}_4^+$ , 吸收的尿素需经过脲酶(urease)还原成  $\text{NH}_4^+$  后才能被利用(Berges *et al*, 1995)。

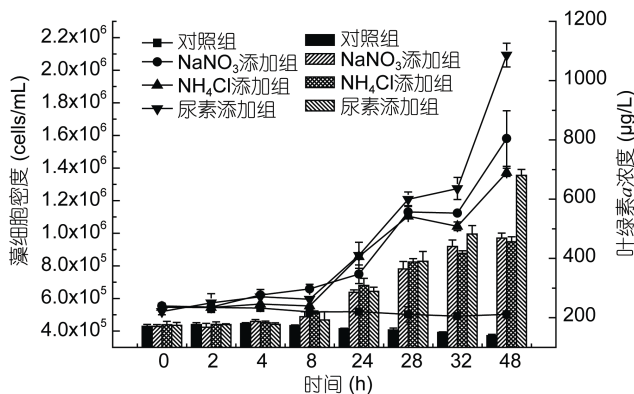


图 1 不同氮源对球形棕囊藻生长的影响

Fig.1 Effects of different nitrogen sources on the growth of *Phaeocystis globosa*

注:折线图为不同氮源条件下藻细胞的生长曲线,柱状图表示叶绿素 *a* 浓度的变化情况

表 1 不同氮源条件下球形棕囊藻的比生长速率(/d)  
Tab.1 Specific growth rate of *Phaeocystis globosa* in different nitrogen sources (/d)

实验组	比生长速率 $\mu$ (24 h)	比生长速率 $\mu$ (48 h)
$\text{NaNO}_3$ 添加组	$0.30\pm 0.05$	$0.75\pm 0.04$
$\text{NH}_4\text{Cl}$ 添加组	$0.45\pm 0.01$	$0.47\pm 0.01$
尿素添加组	$0.44\pm 0.02$	$0.89\pm 0.07$

## 2.2 球形棕囊藻在不同氮源下的吸收利用

氮源是浮游植物生长所必需的生源要素,不同氮源条件下球形棕囊藻细胞的生长结果显示,在 48h 时尿素组的细胞密度和叶绿素 *a* 浓度均高于  $\text{NaNO}_3$  及  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加组(图 1),说明实验条件下尿素更适合球形棕囊藻的生长。在不同氮源对球形棕囊藻生长影响的相关研究中,已有类似的研究报道(胡章喜等, 2010; 秦俊莲等, 2012)。

本实验发现,当培养基中氮源浓度低于  $1\mu\text{mol/L}$  时,  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NH}_4^+$  基本不能被球形棕囊藻吸收利用。培养基中各氮源浓度的变化情况显示(图 2a),  $\text{NH}_4^+$  首先被快速的吸收耗尽, 8h 时其浓度已低至  $1.5\mu\text{mol/L}$ , 24h 时培养基内  $\text{NH}_4^+$  浓度低于  $1\mu\text{mol/L}$ ; 其次是  $\text{NO}_3^-$  被快速消耗, 32h 时培养基内  $\text{NO}_3^-$  浓度已低于  $1.0\mu\text{mol/L}$ , 尿素被消耗的最慢, 在 48h 时培养基中其浓度为  $3.0\mu\text{mol/L}$ 。

单个藻细胞在单位时间内对不同氮源的吸收速率显示(图 2b),在氮源初始浓度为  $50\mu\text{mol/L}$  的条件下,球形棕囊藻对各氮源的吸收速率随时间的延长而降低。实验结果还显示藻细胞对氮源的吸收速率与培养基中氮源浓度呈线性关系( $R^2>0.88$ , 图 3),且相关性分析结果表明,不同氮源条件下培养基中氮源浓度与藻细胞对氮源的吸收速率之间呈显著相关关系( $P<0.01$ )。此外由图 2b 可见,藻细胞对  $\text{NH}_4^+$  的初始吸收速率显著高于对  $\text{NO}_3^-$  及尿素,约为对  $\text{NO}_3^-$  初始吸收速率的 5 倍、尿素初始吸收速率的 10 倍。上述结果表明,经过饥饿处理后,球形棕囊藻对不同氮源的吸收速率受氮源浓度的调控,吸收速率与氮源浓度呈正比关系,且  $\text{NH}_4^+$  浓度的变化对球形棕囊藻吸收速率的影响显著高于  $\text{NO}_3^-$  及尿素浓度变化的影响。Dortch 等(1982)的研究发现,经过氮饥饿处理后的强壮前沟藻(*Amphidinium carterae*)、杜氏盐藻(*Dunaliella tertiolecta*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)及伪矮海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)在分别添加  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{NaNO}_3$  后,藻细胞对  $\text{NH}_4^+$  的初始吸收速率远远高于对  $\text{NO}_3^-$  的吸收速率,本实验结果与此研究结果一致。

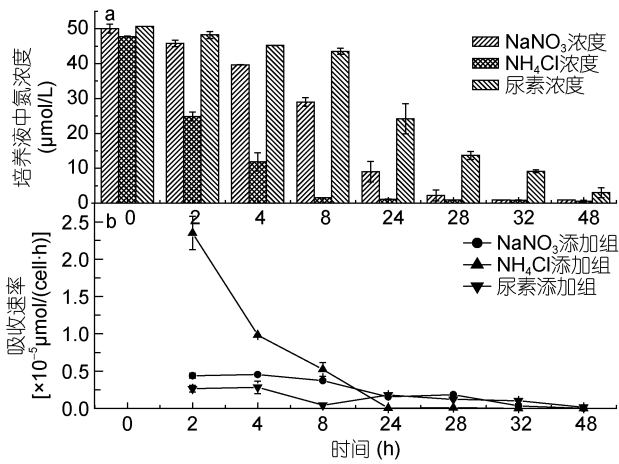


图2 不同氮源条件下实验组培养基中氮源浓度(a)及吸收速率(b)的变化

Fig.2 Variations of nitrogen concentration (a) and uptake rate (b) in the *Phaeocystis globosa* culture in different nitrogen sources

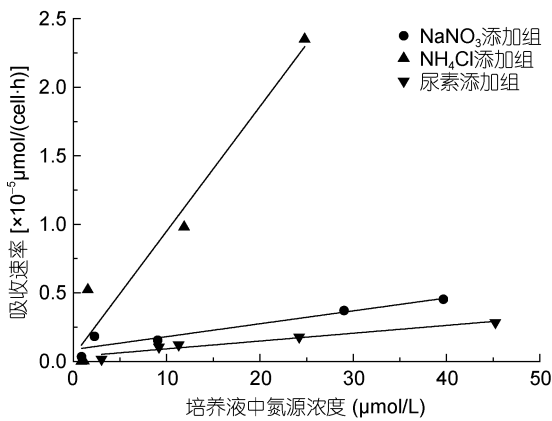


图3 培养基中氮源浓度与吸收速率之间的关系

Fig.3 Relationship between culture nitrogen concentration and uptake rate

### 2.3 不同氮源对球形棕囊藻可溶性蛋白含量的影响

可溶性蛋白不仅是浮游植物参与代谢的各种酶类,也是浮游植物体内氮源的重要储库,可以在外界环境中氮源缺乏的时候供浮游植物利用(Rosenberg *et al.*, 1982),因此,可溶性蛋白含量的变化可作为藻细胞生长状态及氮源利用的参考指标。图4为不同氮源条件下球形棕囊藻单个藻细胞内可溶性蛋白含量的变化情况。由图可见,实验期间对照组单个藻细胞内可溶性蛋白的含量基本保持不变,约为  $2.7 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cell}$ ,实验组可溶性蛋白的含量均高于对照组,且均呈现先升高后降低的趋势,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加组藻细胞内的可溶性蛋白含量升高的最快,在8h时达到最大值  $4.2 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cell}$ ,而后呈下降趋势,48h时含量降至  $3.2 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cell}$ ;  $\text{NaNO}_3$  添加组藻细胞内可溶性蛋白含量

在24h升至最高值  $3.8 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cell}$ ,48h时为  $3.4 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cell}$ ;尿素添加组在8h时可溶性蛋白含量达到最高值,约为  $3.7 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cell}$ ,而后基本保持不变,维持在  $3.4 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{cell}$ 。

由于氮饥饿处理使藻细胞内无机氮和氨基酸被耗尽,细胞内的蛋白含量也降低到低值(Dortch *et al.*, 1982),所以对照组可溶性蛋白含量较低且相对稳定。实验组添加氮源后与氮同化吸收及细胞生长相关的代谢活动开始活跃,与氮吸收及代谢活动相关酶的含量也开始升高,所以可溶性蛋白含量升高。本研究结果显示,氮源添加后被藻细胞快速吸收,但前24h藻细胞的比生长速率低于后24h的比生长速率,说明由于处于氮饥饿状态的球形棕囊藻细胞内氮库亏空,添加入营养盐后,藻细胞快速吸收的氮源首先用于补足体内的氮库,因此初始阶段可溶性蛋白的含量上升,随后由于氮源浓度及吸收速率降低、比生长速率升高的原因,单个藻细胞内的可溶性蛋白含量下降,所以可溶性蛋白含量变化与培养基内氮源浓度变化呈负相关关系。 $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加组培养基内的  $\text{NH}_4^+$  浓度在8h时被消耗低至  $1.5 \mu\text{mol}/\text{L}$ ,可溶性蛋白含量达到最高值,随后其生长速率基本保持不变,可溶性蛋白含量下降,说明可溶性蛋白可为球形棕囊藻体内累积的氮,在外界环境中氮源亏缺时用于维持藻细胞的生长(Chapman *et al.*, 1977)。

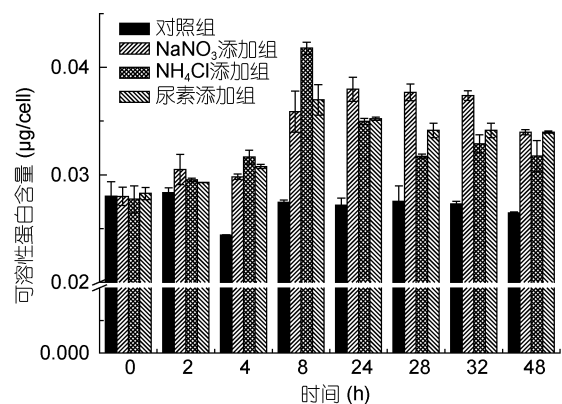


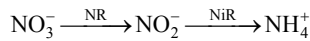
图4 不同氮源条件下球形棕囊藻可溶性蛋白含量的变化

Fig.4 Variation of soluble protein content in *Phaeocystis globosa* cells in the culture of different nitrogen sources

### 2.4 不同氮源对球形棕囊藻硝酸盐还原酶和脲酶活性的影响

氮源在海洋中是影响浮游植物生长的一个重要影响因子,近海水体中硝酸盐是无机氮的主要存在形式,浮游植物对硝酸盐的吸收利用能力影响着近

海初级生产力水平和浮游植物群落的结构组成(王艳等, 2006)。随着现代农业的快速发展, 尿素作为一种有机肥被大量使用, 致使近海海域尿素浓度升高(Glibert *et al*, 2006), 研究发现许多浮游植物可利用尿素作为唯一的氮源生长(Bekheet *et al*, 1977; Peers *et al*, 2000)。硝酸盐还原酶(NR)与脲酶(urease)均为氮同化酶。NR 是浮游植物同化吸收硝酸盐的主要调节酶(Touchette *et al*, 2000)。Solomonson 等(1990)认为植物对硝酸盐的同化机理如下:



(NR: 硝酸盐还原酶, NiR: 亚硝酸盐还原酶)。

脲酶是将尿素转化为能被浮游植物可吸收利用氮源所需的重要水解酶, 能够催化尿素水解为氨及氨基甲酸酯, 氨基甲酸酯进一步水解为氨和碳酸(Mobley *et al*, 1989)。因此, NR 与脲酶活性影响微藻对  $\text{NO}_3^-$  及尿素的同化吸收及生长速率。

图 5 为不同氮源下 NR 活性随时间的变化曲线。结果显示, 氮饥饿及不同氮源条件下均对 NR 活性产生影响, 48h 时各实验组的酶活性均在最低值。对照组随着饥饿时间的延长 NR 活性呈上升趋势, 由开始的  $10.4 \times 10^{-5} \text{pgN}/(\text{cell} \cdot \text{h})$  升高至 48h 的  $15.5 \times 10^{-5} \text{pgN}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ ;  $\text{NaNO}_3$  添加组 NR 活性在 2h 内由  $9.6 \times 10^{-5} \text{pgN}/(\text{cell} \cdot \text{h})$  快速升高至  $15.38 \times 10^{-5} \text{pgN}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ , 随后基本保持稳定, 24h 酶活开始快速降低, 48h 时 NR 活性降至最低值  $2.3 \times 10^{-5} \text{pgN}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  及尿素添加组 NR 活性总体呈下降趋势,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加组 NR 活性开始时快速下降, 4h 后酶活性基本稳定在  $5.5 \times 10^{-5} \text{pgN}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ ; 尿素添加组 NR 活性在前 8h 活性基本保持不变, 而后呈下降趋势, 48h 时 NR 活性降至最低值, 为  $3.5 \times 10^{-5} \text{pgN}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ 。

目前, 关于硝酸盐还原酶活性的研究发现, 一些浮游植物无论在氮饥饿还是不同氮源条件下均可检测到较高的 NR 活性(Dortch *et al*, 1982; Lomas *et al*, 2004), 并且短时间内浮游植物的 NR 活性随着氮饥饿时间的延长而升高(Morris *et al*, 1965; Thomas *et al*, 1985)。Thomas 等(1985)发现氮饥饿环境中, 在 *Porphyra perforate* 细胞内已经检测不到硝酸盐的条件下, NR 仍保持着较高的活性, 认为氮饥饿刺激 NR 活性的表达。本研究也显示处于氮饥饿的对照组 NR 活性呈逐渐增强的趋势, 与文献报道一致。另外, 有研究报道生长环境中一定浓度的  $\text{NO}_3^-$  能够调控浮游植物的 NR 活性升高, 而环境中  $\text{NH}_4^+$  的存在可导致 NR 活性迅速降低(Morris *et al*, 1965; Thomas *et al*,

1985; Lomas, 2004), 产生这种结果的原因可能是硝酸盐还原酶是一种底物诱导酶, 因环境中存在硝酸盐而诱导产生。本研究中球形棕囊藻 NR 活性的变化与上述报道相似,  $\text{NaNO}_3$  添加组 NR 初始阶段具有更高活性, 随着培养基中  $\text{NO}_3^-$  被消耗, NR 活性逐渐降低, 相关性分析显示 NR 活性与培养基中  $\text{NO}_3^-$  浓度呈显著正相关( $P < 0.05$ ), 此外,  $\text{NaNO}_3$  添加组 NR 活性在第 28h 降低, 而同时刻培养基中  $\text{NO}_3^-$  浓度已降至  $2.3 \mu\text{mol/L}$ , 这也证实了硝酸盐还原酶的活性受到硝酸盐浓度的调控, 培养环境中的硝酸盐浓度降低使其活性下降。实验过程中  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和尿素添加组 NR 活性总体呈下降趋势, 表明  $\text{NH}_4^+$  和尿素能够抑制酶活的表达。

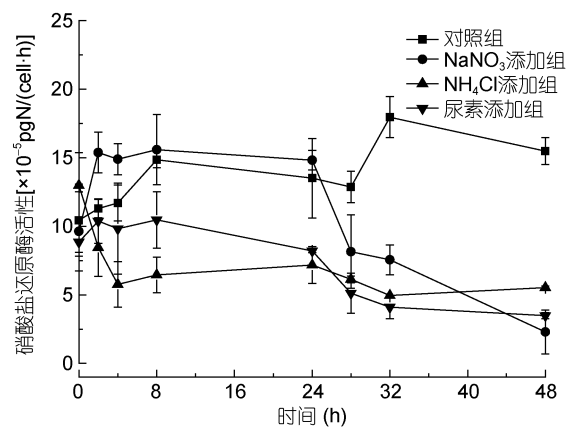


图 5 不同氮源对球形棕囊藻硝酸盐还原酶活性的影响  
Fig5 Effects of different nitrogen sources on nitrate reductase activity of *Phaeocystis globosa* cells

图 6 为在不同氮源条件下脲酶活性的检出随时间的变化情况。实验期间以尿素为氮源球形棕囊藻的脲酶活性高于对照组及另外两个实验组。对照组脲酶活性在 48h 内均较低, 约保持在  $8.8 \times 10^{-3} \text{pgN}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ , 各实验组添加氮源后, 脲酶活性均呈现先升高后降低的趋势, 尿素、 $\text{NaNO}_3$  及  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加组的脲酶活性最高可达  $31.1 \times 10^{-3}$ 、 $23.5 \times 10^{-3}$  和  $22.0 \times 10^{-3} \text{pgN}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ 。

上述结果表明, 以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  或尿素为单一氮源以及处于氮饥饿状态的对照组, 球形棕囊藻的脲酶活性均可表达, 但不同氮源条件下其表达活性有差异, 以  $\text{NaNO}_3$  或  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源条件下脲酶活性低于以尿素为氮源。在以往的报道中, 研究者考察了不同氮源条件下亚历山大藻(*Alexandrium fundyense*)、抑食金球藻(*Aureococcus anophagefferens*)、微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)及威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)的脲酶活性(Dyhrman *et al*,

2003; Fan *et al*, 2003), 得到与本文一致的结论。相关分析发现, 以  $\text{NaNO}_3$  或尿素为氮源的藻细胞脲酶活性与培养基内氮源浓度呈显著的正相关关系 ( $P < 0.05$ ), 这意味着脲酶活性受环境中氮源浓度的调控。上述结果也可能是受藻细胞内氮源浓度的调控, 本研究以饥饿处理后的球形棕囊藻为实验材料, 其胞内的氮库降至低值, 添加氮源后被藻细胞首先迅速吸收进入细胞内补充氮库, 诱导酶活性升高, 随着培养基中氮源浓度和吸收速率降低, 细胞内的氮库中氮浓度必将降低, 酶活性也相应的降低, 在未来的研究中将进一步测定细胞内氮源浓度进行验证。

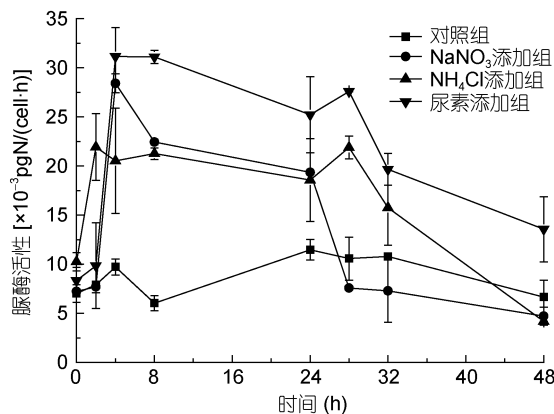


图 6 不同氮源对球形棕囊藻脲酶活性的影响

Fig.6 Effects of nitrogen from different sources on urease activity of *Phaeocystis globosa* cells

由上述结果可知球形棕囊藻在分别以  $\text{NaNO}_3$  和尿素氮源条件下, NR 及脲酶分别表达出最大活性, 约为  $14.68 \times 10^{-5}$  及  $33.83 \times 10^{-3} \text{pgN}/(\text{cell} \cdot \text{h})$ 。且结果显示 NR 的最大酶活低于脲酶的最大酶活性两个数量级, 这可能是在本研究的中尿素组球形棕囊藻密度高于另外两个实验组的主要原因。

### 3 结论

分析本研究的实验结果可以看出, 处于氮饥饿的球形棕囊藻在  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  及尿素作为单一氮源的条件均可生长, 但尿素更适合其生长。产生这种结果的原因主要是由于球形棕囊藻具有较高的脲酶活性, 能使吸收进入藻细胞内尿素更快速的同化利用。 $\text{NH}_4^+$ 虽被认为是最容易被浮游植物同化吸收的氮源, 但本研究结果显示,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加组快速吸收的氮源首先被储存在细胞内, 当培养基中氮源耗尽后用于维持细胞的生长。研究还发现球形棕囊藻在不同氮源或无氮条件下, 细胞内的 NR 和脲酶均可表达, 说

明球形棕囊藻在不同氮源条件下具有一定的竞争优势, 可更好的适应野外的环境。

### 参 考 文 献

- 王 艳, 唐海溶, 蒋 磊等, 2006. 硝酸盐对球形棕囊藻生长和硝酸还原酶活性的影响. 植物学通报, 23(2): 138—144
- 王学奎, 2006. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社
- 李 波, 蓝文陆, 李天深等, 2015. 球形棕囊藻赤潮消亡过程环境因子变化及其消亡原因. 生态学杂志, 34(5): 1351—1358
- 沈萍萍, 王 艳, 齐雨藻等, 2000. 球形棕囊藻的生长特性及生活史研究. 水生生物学报, 24(6): 635—643
- 胡章喜, 徐 宁, 段舜山, 2010. 不同氮源对 4 种海洋微藻生长的影响. 生态环境学报, 19(10): 2452—2457
- 秦俊莲, 俞梦洁, 李 璇等, 2012. 不同氮源对球形棕囊藻生长的影响. 生态科学, 31(3): 273—277
- Berman T, Chava S, 1999. Algal growth on organic compounds as nitrogen sources. Journal of Plankton Research, 21(8): 1423—1473
- Bekheet I A, Syrett P J, 1977. Urea-degrading enzymes in algae. British Phycological Journal, 12(2): 137—143
- Berges J A, Harrison P J, 1995. Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. Limnology and Oceanography, 40(1): 82—93
- Chapman A R O, Craigie J S, 1977. Seasonal growth in *Laminaria longicruris*: relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen. Marine Biology, 40(3): 197—205
- Dyrhman S T, Anderson D M, 2003. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. Limnology and Oceanography, 48(2): 647—655
- Dortch Q, Clayton J R Jr, Thoreson S S *et al*, 1982. Response of marine phytoplankton to nitrogen deficiency: decreased nitrate uptake vs enhanced ammonium uptake. Marine Biology, 70(1): 13—19
- Fan C, Glibert P M, Alexander J *et al*, 2003. Characterization of Urease activity in three marine phytoplankton species, *Aureococcus anophagefferens*, *Prorocentrum minimum*, and *Thalassiosira weissflogii*. Marine Biology, 142(5): 949—958
- 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
- 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
- Liu J S, Van Rijssel M, Yang W D *et al*, 2010. Negative effects of *Phaeocystis globosa* on microalgae. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 28(4): 911—916

- Lobban C S, Harrison P J, 1994. Seaweed Ecology and Physiology. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 8
- Lomas M W, 2004. Nitrate reductase and urease enzyme activity in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae): interactions among nitrogen substrates. *Marine Biology*, 144(1): 37—44
- Mobley H L, Hausinger R P, 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological Reviews*, 53(1): 85—108
- Moore L R, Post A F, Rocap G, et al, 2002. Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Limnology and oceanography*, 47(4): 989—996
- Morris I, Syrett P J, 1965. The effect of nitrogen starvation on the activity of nitrate reductase and other enzymes in *Chlorella*. *Microbiology*, 38: 21—28
- Peers G S, Milligan A J, Harrison P J, 2000. Assay optimization and regulation of Urease activity in two marine diatoms. *Journal of Phycology*, 36(3): 523—528
- Ryther J H, Dunstan W M, 1971. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*, 171(3975): 1008—1013
- Rosenberg C, Ramus J, 1982. Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae): soluble nitrogen and reserve carbohydrates. *Marine Biology*, 66(3): 251—259
- Smith W O Jr, Codispoti L A, Nelson D M et al, 1991. Importance of *Phaeocystis* blooms in the high-latitude ocean carbon cycle. *Nature*, 352(6335): 514—516
- Solomonson L P, Barber M J, 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 41(1): 225—253
- Thomas T E, Harrison P J, 1985. Effect of nitrogen supply on nitrogen uptake, accumulation and assimilation in *Porphyra perforata* (Rhodophyta). *Marine Biology*, 85(3): 269—278
- Touchette B W, Burkholder J A M, 2000. Review of nitrogen and phosphorus metabolism in seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 250(1—2): 133—167

## ABSORPTION AND UTILIZATION OF DIFFERENT NITROGEN SOURCES BY *PHAEOCYSTIS GLOBOSA*

MENG Rui<sup>1,2,3</sup>, SONG Xiu-Xian<sup>1,2,3</sup>, LIU Shu-Ya<sup>1,2,3</sup>, JIANG Wen-Bin<sup>1,2,3</sup>, YU Zhi-Ming<sup>1,2,3</sup>

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** Effect of nitrogen sources on growth of *Phaeocystis globosa* was studied from the perspectives of nutrient utilization in physio-biochemistry. The results show that under the same initial nitrogen concentration, *P. globosa* had a higher cell density and chlorophyll *a* concentration when urea but nitrate or ammonia was used as the sole nitrogen source. Additionally, both nitrate reductase activity and urease activity were regulated by the concentration and uptake rate of ambient nitrogen source, in which the nitrate reductase activity and urease activity maximized when grown with nitrate and urea respectively. Furthermore, a high density of *P. globosa* cells may contribute to urease activity rather than nitrate reductase activity, which was observed when urea was used as the sole nitrogen source. Moreover, nitrogen starved *P. globosa* cells had a very high initial ammonia uptake rate, and the ammonia concentration was depleted to 1.5 μmol/L after cultured for 8h, in which the growth rate of cells stabilized at a low level. The results indicate that the intracellular reserved ammonia source could be used for the cell growth after ambient nitrogen was depleted.

**Key words** *Phaeocystis globosa*; nitrogen; nitrate reductase; urease