

DOI: 10.5846/stxb201408251681

蔡雨, 刘静雅, 秦俊莲, 孙树刚, 段舜山, 徐宁. 环境因子对东海原甲藻生长及脲酶活性的影响. 生态学报, 2016, 36(6): - .

Cai Y, Liu J Y, Qin J L, Sun S G, Duan S S, Xu N. Effects of environmental factors on the growth and urease activity of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense*. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(6): - .

环境因子对东海原甲藻生长及脲酶活性的影响

蔡 雨, 刘静雅, 秦俊莲, 孙树刚, 段舜山, 徐 宁*

暨南大学生态学系, 水生生物研究所, 广州 510632

摘要:以我国东南沿海大规模赤潮原因种东海原甲藻为实验材料, 研究了环境因子对其生长及脲酶活性的调控作用。结果表明, 东海原甲藻的适宜生长温度为 20—25 °C, 而 25 °C 下脲酶活性最高。在光强 $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 条件下细胞密度显著下降 ($P < 0.05$), 但仍能维持较高的脲酶活性 ($9.405 \text{ fmol h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$)。在盐度 20—40 范围内, 东海原甲藻能够维持快速生长和较高的脲酶活性。氮源组成对东海原甲藻生长无显著影响, 但对脲酶活性影响较大。具体而言, 东海原甲藻脲酶活性与尿素浓度呈显著正相关关系, 而无机氮源 NH_4^+ 和 NO_3^- 对其脲酶活性具有显著的抑制作用, 在氮缺乏条件下脲酶活性明显增强。东海原甲藻脲酶活性对环境温度、光照、盐度和营养的响应特征可能是在长期进化中形成的生态适应策略, 使其在无机氮源不足时得以转而利用有机氮源, 从而在资源竞争中占据有利地位。

关键词: 东海原甲藻; 脲酶活性; 生长; 尿素; 环境因子

Effects of environmental factors on the growth and urease activity of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense*

CAI Yu, LIU Jingya, QIN Junlian, SUN Shugang, DUAN Shunshan, XU Ning*

Department of Ecology, Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: In the last few decades, the geographic distribution and frequency of harmful algal blooms (HABs) have been increasing worldwide, and have resulted in severe economic losses and ecological disaster. There has been a scientific consensus that there is a positive relationship between occurrences of HABs and increased eutrophication due to human activities in coastal waters. Studies demonstrated that urea has seen wide use in agriculture as a major nitrogen fertilizer in recent years, and consequently, concentrations of urea in aquatic environments have increased dramatically, becoming an important component of dissolved organic nitrogen (DON) in coastal waters. Other studies demonstrated the presence of a positive correlation between the increased input of urea into coastal waters and HABs frequencies. However, the ecological role of urea in triggering HABs, and the mechanism by which it does so (in a species-specific and physiological context in particular), are still unclear. The armored dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* is a representative HABs-causing alga found in the southeastern coastal waters of China, and has caused serious damage to fisheries and aquaculture facilities, and threatened coastal aquatic ecosystems. This species has shown a wide range of tolerance to light, temperature, and salinity, and is capable of utilizing both inorganic (NO_3^- and NH_4^+) and organic (e.g. urea and amino acids) forms of nitrogen (N). Based on our prior study, in which we demonstrated that *P. donghaiense* exhibits a higher growth rate when grown in media containing urea as the sole N source, compared to those grown with NO_3^- as the N source, we investigated the effects of environmental factors (temperature, light intensity, and salinity) on the growth of *P. donghaiense*, and further explored the

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1133003, 40776078)

收稿日期: 2014-08-25; 网络出版日期: 2015-06-11

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: txuning@163.com

potential regulating effects of these factors and different forms of N on the activity of urease, a key enzyme involved in the metabolism of urea. The optimal temperatures for *P. donghaiense* growth were between 20 and 25°C, while the highest urease activity was observed at 25°C. Light was observed to significantly influence urease activity: high urease activity ($9.405 \text{ fmol h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$) was observed even at lower irradiance levels ($<2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), where the cell density was the lowest. Compared to light and temperature, salinity had the smallest impact on growth and urease activity, i.e., both relatively high growth rates and urease activity were measured at salinities ranging from 20 to 40 psu. Regarding the different effects of different nitrogen resources, *P. donghaiense* was capable of using all forms of nitrogen provided: NO_3^- , NH_4^+ , and urea, to meet its growth requirement. However, urease activity, was significantly inhibited by NH_4^+ and NO_3^- , but enhanced by the presence of elevated concentrations of urea. More specifically, *P. donghaiense* exhibited the strongest urease activity three days after inoculation in the urea treatment group, while, in contrast, urease activity in media with NH_4^+ or NO_3^- as the sole N source did not change significantly over time and was significantly lower than that observed in the urea-augmented medium. Moreover, we found that NH_4^+ had a stronger inhibitory effect on the urease activity of *P. donghaiense* than NO_3^- . In the N source conversion experiments, urease activity in the NH_4^+ substrate was still lower than that in NO_3^- substrate after the addition of equal amount of urea. In addition, urease activity was significantly elevated when ambient nitrogen was deficient. The response of *P. donghaiense* urease activity and growth rates to the temperature, light, salinity, and nutrient differences observed in this study may reflect an ecological adaptation of *P. donghaiense*, which allows it to make use of organic nitrogen when inorganic nitrogen sources are insufficient, providing *P. donghaiense* with a competitive advantage over co-occurring phytoplankton species when the availability of urea is higher than inorganic forms of nitrogen.

Key Words: *Prorocentrum donghaiense*; urease activity; growth; urea; environmental factors

东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)是近年来中国东海大规模赤潮的主要种类。据统计,2002—2008年间福建沿岸海域共发生东海原甲藻赤潮25起,其中2004年5月初发生的赤潮面积达 $10\,000 \text{ km}^2$ ^[1-2]。东海原甲藻赤潮不仅造成巨大的经济损失,同时也带来严重的生态、资源和环境问题^[1,3]。研究显示,东海原甲藻对低光照、较低温度(10—20℃)、变化盐度的适应能力及其独特的营养竞争策略可能是其形成赤潮的重要原因^[3-7]。

随着全球有机氮肥使用的不断增加,大量尿素进入近岸水体,成为溶解有机氮(dissolved organic nitrogen, DON)库的重要组成成分。有报道指出,切萨皮克湾海域夏季的尿素N浓度高达25—50 $\mu\text{mol/L}$,占DON的比例最高可达90%^[8]。我国大亚湾的尿素N浓度平均为28.2 $\mu\text{mol/L}$ ^[3]。有研究表明,许多甲藻利用尿素的能力胜过 NO_3^- ^[9]。如美国加利福利亚的Newport海滩附近的多边舌甲藻(*Lingulodinium polyedrum*)赤潮期间,尿素的吸收率就高于 NO_3^- 和 NH_4^+ ^[10]。东海原甲藻以尿素为氮源条件下的最大比生长速率也高于 NO_3^- ^[4]。此外,尿素对浮游植物群落吸收总氮的贡献率与甲藻所占比例高度相关,因此高水平浓度的尿素可能诱发甲藻赤潮暴发^[11-13]。

研究表明,浮游植物通过主动或被动运输途径吸收尿素后,必须由脲酶将其转化为 CO_2 和 NH_4^+ 才能供细胞利用^[14]。近几十年,已经发现许多浮游植物具有脲酶基因,但是关于微藻脲酶活性的研究仍然很有限。本文以东海原甲藻为实验对象,研究了温度、光照、盐度和营养盐对其种群生长及脲酶活性的影响,为深入了解尿素在赤潮藻生长及赤潮形成的作用提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与培养条件

东海原甲藻(JX-1)采自我国东海赤潮高发海区,经毛细管分离培养成单细胞株系,保存于暨南大学水生生物研究中心藻种库。

试验藻种于室内光照培养箱(广东省医疗器械厂,LRH-400-G)中培养,除特殊说明外,温度(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,辐照强度约 $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光暗比 12 h : 12 h。选用 f/2 培养基,基础介质为人工海水(盐度为 30.5 psu)^[15]。

1.2 实验设计

1.2.1 光照、温度和盐度实验

预培养:将指数生长期的东海原甲藻细胞接种至无氮、磷的 f/2 培养基,另添加 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 500 $\mu\text{gN/L}$, NaH_2PO_4 100 $\mu\text{gP/L}$,培养 3 轮以上。

实验方法:将东海原甲藻转接至含 600 mL 培养基(同上)的三角瓶中,分别设置不同的光照(2、30、100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、温度(15、20、25 $^{\circ}\text{C}$)或盐度(20、25、30、35、40 psu)条件,置于室内光照培养箱中培养,每组 3 个平行。每隔 24 h 取 5 mL 藻液观察并测定其吸光值 OD_{680} 。每隔 48 h 取 10 mL 藻液观察、计数,并测定脲酶活性^[16]。取指数增长后期(第 6 d)的藻液收集部分藻粉,测定其细胞碳氮比(CHNS/O 2400, Perkin Elmer)。脲酶活性测定方法:尿酶活性方法测定参照徐宁等^[16],并以单个细胞单位时间内所产生氨的量来表示脲酶活性。

1.2.2 氮源组成实验

预培养:设置如下 6 种氮源组成: NaNO_3 (a 组), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (b 组), NH_4Cl (c 组), NaNO_3 和 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 各占 1/2(d 组), NH_4Cl 和 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 各占 1/2(e 组), NaNO_3 、 NH_4Cl 、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 各占 1/3(f 组)。设置氮浓度为 500 $\mu\text{gN/L}$,磷浓度为 100 $\mu\text{gP/L}$ 。将处于指数生长期的东海原甲藻分别接种至上述培养基中进行 3 轮预培养。

实验方法:经预培养的东海原甲藻等量接种于装有 600 mL f/2 培养基(氮磷如上添加)的三角瓶中,每组 3 个平行。将三角瓶置于室内光照培养箱中培养。每隔 24 h 取 5 mL 藻液观察并测定其吸光值 OD_{680} 。每隔 24 h 取 10 mL(三份)的藻液观察、计数,并测定脲酶活性。

1.2.3 氮源转换实验

预培养:调整 f/2 培养基氮源为 NaNO_3 (A 组)或 NH_4Cl (B 组),氮浓度为 500 $\mu\text{g N/L}$,同时调整磷浓度为 100 $\mu\text{g P/L}$,将处于指数生长期的东海原甲藻分别接种至上述培养基中预培养三轮。

实验方法:将经过预培养的东海原甲藻离心清洗后,等量接种于装有 1500 mL 培养基(培养基成分同预培养)的三角瓶中,每组 3 个重复。将三角瓶置于室内光照培养箱中培养,至培养基中无氮时,加入 500 $\mu\text{g N/L}$ 的 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 和 100 $\mu\text{g P/L}$ 的 NaH_2PO_4 ,继续以相同条件培养。每隔 24 h 取 5 mL 藻液观察并测定其吸光值 OD_{680} 。每隔 24 h 取 10 mL(三份)的藻液观察、计数,并分别测定脲酶活性。

1.3 统计分析

使用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析,Origin 7.5 绘图。

2 结果与分析

2.1 盐度、温度和光照强度对东海原甲藻生长及脲酶活性的影响

实验结果显示,东海原甲藻在 20—40 psu 盐度范围和 15—25 $^{\circ}\text{C}$ 水温范围内均能够快速生长。盐度为 25 psu 和 30 psu 条件下的细胞密度显著高于其它 3 组($P<0.05$)(图 1A)。20 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 实验组的最大细胞密度和最大比生长速率都显著大于 15 $^{\circ}\text{C}$ 实验组($P<0.05$)(图 1B)。在 2 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光照强度下,东海原甲藻细胞密度基本不变,在 30 和 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光照条件下,东海原甲藻的生长显著高于 2 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($P<0.05$)(图 1C)。

所有实验组均能检测到脲酶活性,且变化趋势相似:接种后第 3 天活性最高,然后随着处理时间的延长而下降(图 2)。从图 2 可以看出,水温对东海原甲藻脲酶活性影响最大。25 $^{\circ}\text{C}$ 组具有最高脲酶活性(12.81 $\text{fmol h}^{-1}\text{cell}^{-1}$),其次是 20 $^{\circ}\text{C}$ 组(11.02 $\text{fmol h}^{-1}\text{cell}^{-1}$),而 15 $^{\circ}\text{C}$ 组最高脲酶活性仅为 7.055 $\text{fmol h}^{-1}\text{cell}^{-1}$,约为 25 $^{\circ}\text{C}$ 实验组的 50%,显著低于其他两组($P<0.05$)(图 2B)。光照是除温度外影响东海原甲藻脲酶活性的重要因

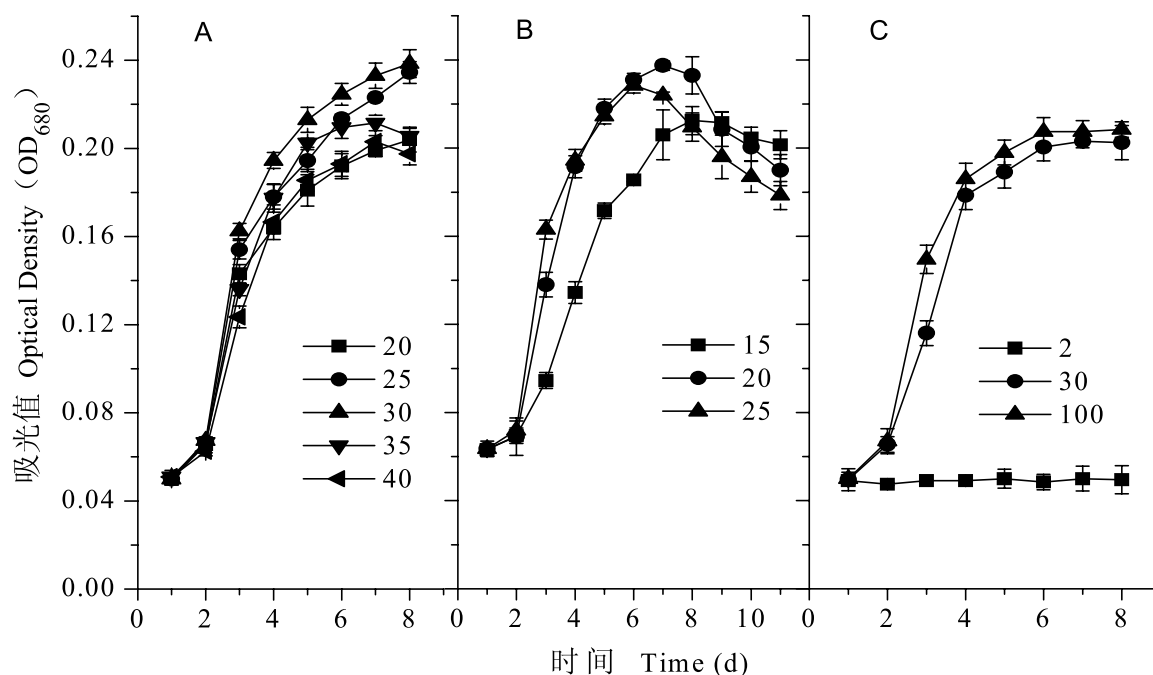


图1 盐度 (psu,A)、温度 (°C,B) 和光照强度 ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,C) 对东海原甲藻生长的影响

Fig. 1 Effects of salinity (psu, A), temperature ($^{\circ}\text{C}$, B) and light intensity ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, C) on the growth of *Prorocentrum donghaiense*

素。光照在大于 $30\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时对脲酶活性无显著影响 ($P>0.05$)。但当光照强度为 $2\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 时,其脲酶活性 $9.405\ \text{fmol h}^{-1}\text{cell}^{-1}$,显著低于其它两组 ($P<0.05$) (图 2C)。盐度对藻细胞脲酶活性的影响较小。盐度为 25—35 实验组最大脲酶活性均高于 $11\ \text{fmol h}^{-1}\text{cell}^{-1}$,显著高于盐度 20 和 40 的实验组 ($P<0.05$) (图 2A)。东海原甲藻细胞碳氮比 (C/N) 实验结果显示: $15\ ^{\circ}\text{C}$ 实验组 C/N 比值为 11.06,远小于 20 和 $25\ ^{\circ}\text{C}$ 实验组 ($P<0.05$)。而 $2\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光照组 C/N 值为 8.15,显著小于 30 和 $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光照组其他两组 ($P<0.05$) (表 1)。不同盐度实验组 C/N 比值差异不显著。

表 1 盐度、温度和光照强度对东海原甲藻碳氮比的影响

Table 1 Effects of salinity, temperature, light intensity on Carbon /Nitrogen (C/N) ratio of *P. donghaiense*

处理组 Treatment group		碳平均含量 Carbon content %	氮平均含量 Nitrogen content %	碳氮质量比 Ratio of C/N	碳氮比标准偏差 Standard deviation of C/N
盐度 Salinity/(psu)	20	24.02	1.13	21.26	0.876
	25	31.01	1.48	20.95	0.743
	30	29.94	1.36	22.01	0.699
	35	32.47	1.42	22.87	0.823
	40	28.86	1.17	24.67	0.847
温度 Temperatrue/($^{\circ}\text{C}$)	15	37.16	3.36	11.06 *	0.7
	20	47.64	1.85	25.75	0.85
	25	47.46	1.98	23.97	0.79
光照 Light intensity / ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	2	5.54	0.68	8.15 *	0.47
	30	27.55	1.33	20.71	0.49
	100	44.97	2.14	21.01	0.56

* 表示 $P<0.05$,与其他组别相比,有显著差异

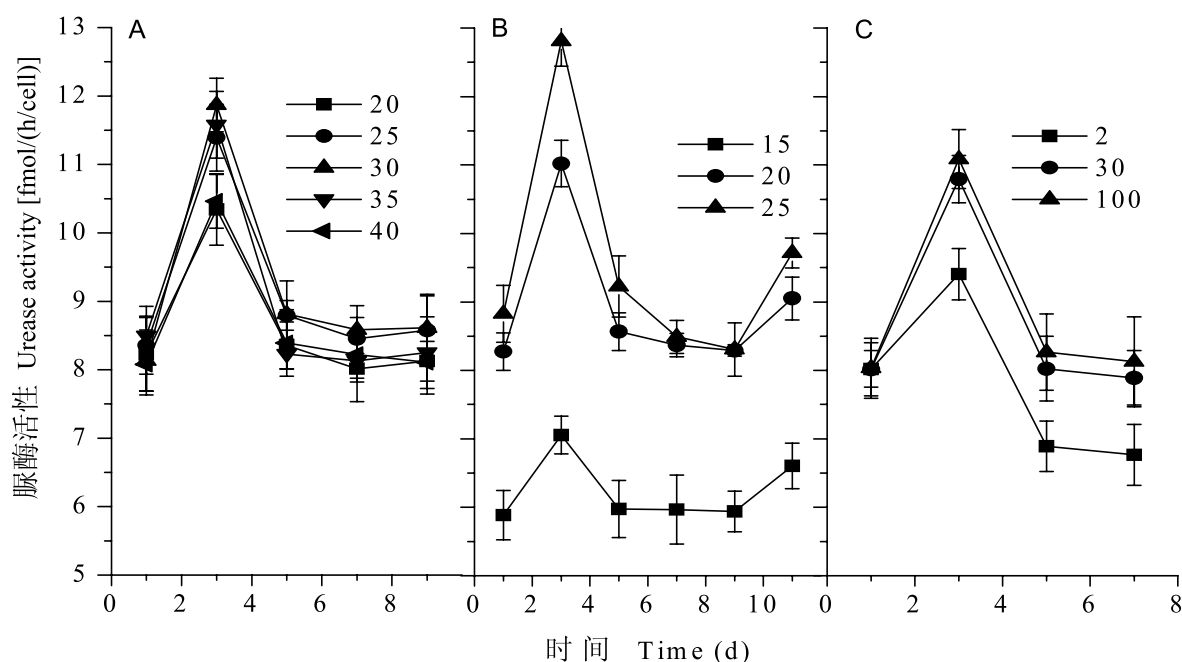


图2 盐度 (psu, A)、温度 (°C, B) 和光照强度 ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, C) 对东海原甲藻脲酶活性的影响

Fig. 2 Effects of salinity (psu, A), temperature ($^{\circ}\text{C}$, B) and light intensity ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, C) on urease activity of *P. donghaiensis*

2.2 氮源的组成对东海原甲藻生长及脲酶活性的影响

实验结果表明,东海原甲藻能以尿素、 NO_3^- 和 NH_4^+ 为唯一氮源正常生长。第2天进入指数生长期,第5—6天进入稳定期。铵氮组 ($500 \mu\text{g NH}_4\text{Cl-N} \cdot \text{L}^{-1}$) 最高细胞密度显著高于其它实验组 ($P < 0.05$) (图3)。

如图4所示,各实验组均可检测出脲酶活性。b组(尿素)第1天的脲酶活性显著高于其它组 ($P < 0.05$),第3天(指数生长初期)的脲酶活性达到最大值,为 $11.27 \text{ fmol h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$,而后下降并趋于平稳,与接种时相近。含1/2—1/3 尿素氮的d、e、f组第3天(指数生长初期)脲酶活性略下降而后升高,到第7天(指数生长末期)达最大值,分别为 9.48 、 8.82 、 $8.25 \text{ fmol h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$,且d组(1/2 尿素氮)显著大于f组(1/3 尿素氮) ($P < 0.05$)。

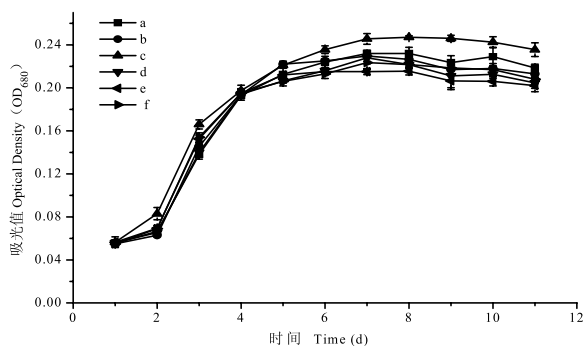


图3 氮源组成对东海原甲藻生长的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen sources on the growth of *P. donghaiensis*

(a; $500 \mu\text{g NaNO}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$; b; $500 \mu\text{g CO}(\text{NH}_2)_2\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$; c; $500 \mu\text{g NH}_4\text{Cl-N} \cdot \text{L}^{-1}$; d; $250 \mu\text{g NaNO}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$, $250 \mu\text{g CO}(\text{NH}_2)_2\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$; e; $250 \mu\text{g NH}_4\text{Cl-N} \cdot \text{L}^{-1}$, $250 \mu\text{g CO}(\text{NH}_2)_2\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$; f; $167 \mu\text{g NaNO}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$, $167 \mu\text{g NH}_4\text{Cl-N} \cdot \text{L}^{-1}$, $167 \mu\text{g CO}(\text{NH}_2)_2\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$)

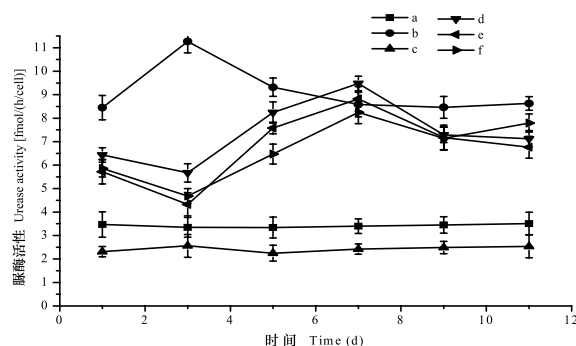


图4 氮源组成对东海原甲藻脲酶活性的影响

Fig. 4 Effects of nitrogen sources on urease activity of *P. donghaiensis*

(a; $500 \mu\text{g NaNO}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$; b; $500 \mu\text{g CO}(\text{NH}_2)_2\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$; c; $500 \mu\text{g NH}_4\text{Cl-N} \cdot \text{L}^{-1}$; d; $250 \mu\text{g NaNO}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$, $250 \mu\text{g CO}(\text{NH}_2)_2\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$; e; $250 \mu\text{g NH}_4\text{Cl-N} \cdot \text{L}^{-1}$, $250 \mu\text{g CO}(\text{NH}_2)_2\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$; f; $167 \mu\text{g NaNO}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$, $167 \mu\text{g NH}_4\text{Cl-N} \cdot \text{L}^{-1}$, $167 \mu\text{g CO}(\text{NH}_2)_2\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$)

培养基中不含尿素的 a、c 组脲酶活性在实验期间保持不变,且显著小于其他 4 组 ($P < 0.05$),但 a 组(硝氮组)的脲酶活性略大于 c 组(铵氮组)。实验结果表明,氮源组成是影响东海原甲藻细胞脲酶活性的重要因素。最大脲酶活性与尿素浓度呈显著正相关 ($R = 0.977$)。

2.3 氮源转换对东海原甲藻生长及脲酶活性的影响

实验结果显示,东海原甲藻在以硝氮(A 组)和铵氮(B 组)为唯一氮源时均能快速生长,且铵氮组细胞密度显著高于硝氮组 ($P < 0.05$)。在培养基中补充尿素后,硝氮组比铵氮组(停滞 1 天)早 1 天重新进入指数生长期,且前期细胞密度显著高于铵氮组 ($P < 0.05$),但后期两组细胞密度相近 ($P > 0.05$) (图 5)。

A、B 两组均可检测出东海原甲藻脲酶活性。在加入尿素前(第 8 天前),A、B 两组脲酶活性都趋于稳定,但 A 组显著高于 B 组 ($P < 0.05$)。加入尿素后(第 8 天后),两组脲酶活性均迅速升高。A、B 组分别在第 10 和 11 天达到最大值,分别为 10.47 、 $9.82 \text{ fmol h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$,且 A 组显著高于 B 组 ($P < 0.05$),其后均开始下降(图 6)。

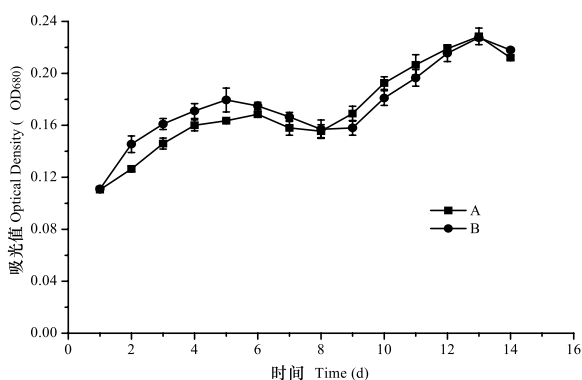


图 5 氮源转换对东海原甲藻生长的影响

Fig. 5 Effects of nitrogen source conversion on the growth of *P. donghaiense*

(A: $500 \mu\text{g NaNO}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$; B: $500 \mu\text{g NH}_4\text{Cl-N} \cdot \text{L}^{-1}$)

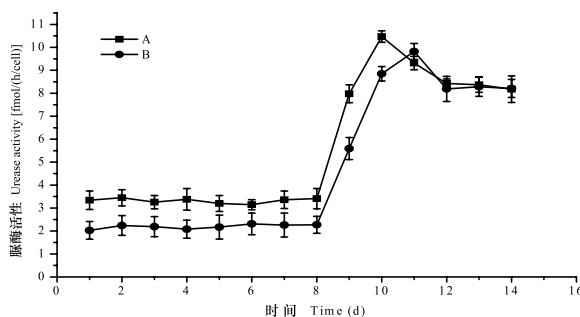


图 6 氮源转换对东海原甲藻脲酶活性的影响

Fig. 6 Effects of nitrogen source conversion on urease activity of *P. donghaiense*

(A: $500 \mu\text{g NaNO}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$; B: $500 \mu\text{g NH}_4\text{Cl-N} \cdot \text{L}^{-1}$)

3 讨论

3.1 温度、光照和盐度对东海原甲藻脲酶活性的影响

实验室研究结果表明,在 $20\text{—}27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度范围内东海原甲藻的生长速率大于 0.60 d^{-1} [4]。野外调查发现,东海原甲藻赤潮期间水温为 $18.5\text{—}21.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ [17-18],类似地,本研究结果显示, $20\text{—}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水温条件下东海原甲藻细胞密度较高, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时细胞密度有所下降,与野外调查结果一致(图 1B)。本研究采用以尿素为唯一氮源的低氮培养条件,在培养至第八天后东海原甲藻的生长出现衰退现象(图 1)。王宗灵等的研究也发现,在 N 限制条件下,东海原甲藻的生长在第 5 天就出现衰退现象 [19]。由此可见东海原甲藻的生长受到环境条件尤其是营养状况的调控。

本研究结果显示, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 实验组的最大脲酶活性显著高于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 组(图 2B)。我们的前期研究发现,东海原甲藻的脲酶活性在 $15\text{—}70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间随着温度的升高而增强,当温度达到 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以后,脲酶活性急剧降低 [16]。可能的原因是脲酶是一个热稳定性的酶 [20]。野外调查也表明,脲酶活性最高出现在夏季,比春秋两季高出 5 倍 [21-22]。并且,在河口尿素的最高吸收率也出现在夏季,最低吸收率出现在冬季 [22]。这些报道与本实验结果一致。东海原甲藻脲酶活性与温度的正相关关系可能是在长期进化中形成的适应特征。水温较低时,浮游植物生长缓慢,水体营养盐含量较高,东海原甲藻对尿素的吸收不是必要的。而水温较高时,浮游植物生长迅速,对营养盐的竞争加剧,无机氮源已经无法满足其生长的需要。此时,对尿素的吸收能够有效补充氮源,成为东海原甲藻重要的竞争策略。然而,有研究指出,在硅藻为优势种的水体中尿素的吸收率与温度呈负

相关^[23]。另外,在 Chesapeake 湾和 Neuse 河口的现场研究发现,10—25 °C 范围内微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)对尿素的吸收率保持不变^[24]。因此,海洋微藻脲酶活性对温度的响应关系可能是因种而异的。

实验室研究发现,东海原甲藻在 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的光照强度下,种群生长接近饱和^[4],即光照需求显著低于其他赤潮藻,因此在高混浊海水中具有形成赤潮的优势^[25]。本研究也证实,在 30 和 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的光照强度下东海原甲藻生长并无显著差异,但在 2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 的低光照条件下无法生长(图 1C)。可能的原因是,东海原甲藻对尿素的吸收需要消耗能量通过尿素转移酶完成,而低光强不足以支持藻细胞对尿素的吸收^[8,26-27]。另一方面,低光照强度下东海原甲藻光合作用速率降低,脲酶将尿素转化为氨,使氨在藻体内被大量积累,进而抑制藻脲酶活性^[8]。有趣的是,即使在低光照(2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)条件下,东海原甲藻细胞脲酶活性仍维持在较高水平(9.405 $\text{fmol h}^{-1} \text{cell}^{-1}$)表明藻细胞在不利于生长的条件下能够持续吸收、积累尿素(图 2C)。此时藻细胞的碳氮质量比为 8.15,显著高于其它处理组(表 1),表明低光照对光合作用的影响大于对氮吸收的影响。东海原甲藻在低光照条件下对尿素的吸收能力对于维持种群的生存具有重要生态意义。

东海原甲藻盐度适应范围较广,为 20—40 psu,适宜生长的盐度介于 25—35 psu 之间^[16]。藻细胞在高盐度下生长需要更多能量,脂肪含量也相应增加,而当盐度适当降至其原环境的盐度 2/3 时,对其生长有明显的促进作用^[28]。本研究表明,盐度对东海原甲藻脲酶活性影响不大(图 2A)。盐度为 25—35 psu 条件下东海原甲藻脲酶活性较高,盐度 20 和 40 psu 的实验组脲酶活性有所降低(图 2A)。沿海水体的盐度范围一般介于 25—35 psu 之间,有利于东海原甲藻对尿素的吸收和利用。

3.2 氮源对东海原甲藻脲酶活性的影响

在本研究设置的 6 种不同单一或混合氮源条件下,东海原甲藻的生长速率和细胞密度均差异不大(图 3),表明东海原甲藻对于不同氮源具有灵活的吸收、利用机制。类似地研究发现,微小原甲藻具有多种氮源利用机制,其中对 NH_4^+ 的吸收速率最大,对 NO_3^- 、尿素和混合氨基酸的吸收速率无明显差异^[24]。另外,利马原甲藻(*Prorocentrum lima*)分别以 NO_3^- 、 NH_4^+ 、尿素为唯一氮源时,其最大比生长速率无显著性差异^[29]。

本研究发现,在不同氮源条件下东海原甲藻的脲酶活性显示出不同的变化趋势(图 4)。首先,东海原甲藻脲酶活性取决于环境中是否存在尿素,且活性高低与尿素浓度呈正相关关系。如在氮源实验中,尿素组具有最高的脲酶活性, NO_3^- 、 NH_4^+ 组的脲酶活性始终维持在最低水平,而混合氮源组介于二者之间(图 4)。其次,相对于尿素水体中无机氮源 NH_4^+ NO_3^- 的存在对东海原甲藻脲酶活性具有显著的抑制作用(图 4)。在氮源实验中,混合氮源组脲酶活性在第 7 天才达到最高值。这可能是因为东海原甲藻优先利用无机氮,而当无机氮不足以满足其氮需求时,脲酶活性才会增加。而且,比之 NO_3^- 、 NH_4^+ 对脲酶的抑制作用更为明显。如实验结果显示,单独氮源 NH_4^+ 组脲酶活性始终显著低于 NO_3^- 组(图 4)。而在氮源转换实验中,即使实验后期添加了等量尿素,较之 NO_3^- 组, NH_4^+ 组脲酶活性仍然显著偏低,且响应速度较慢(图 6)。另外,我们注意到在氮缺乏条件下东海原甲藻脲酶活性明显增强。在实验后期,所有实验组东海原甲藻脲酶活性均有所回升(图 6)。此时种群生长已进入衰亡期,水体氮浓度已显著降低并抑制了东海原甲藻的生长。

Solomon 和 Glibert 的研究显示,在含有脲酶的浮游植物中,脲酶总有基础活性,而活性高低却受氮源的调控,如微小原甲藻和卡罗藻(*Karlodinium veneficum*)在 NO_3^- 和尿素中的脲酶活性要比在 NH_4^+ 中高^[30]。另有研究发现,在 N 饥饿时亚历山大藻脲酶活性会增加^[14]。野外调查显示,浮游植物脲酶活性高低与 NO_3^- 、 NH_4^+ 浓度呈负相关^[8]。这与我们对东海原甲藻的研究结果一致。因此, NO_3^- 和 NH_4^+ 可能是脲酶活性的下行调节物^[8]。然而,不同来源的研究结果也显示出明显的差异性。如渦鞭藻(*Heterocapsa triquetra*)在 NH_4^+ 中的脲酶活性要比在 NO_3^- 和尿素中高^[30]。类似地,较早的研究也指出,氮缺乏或尿素培养的丰迪亚历山大藻(*Alexandrium fundyense*)脲酶活性最高, NH_4^+ 次之,而 NO_3^- 中没检测到脲酶活性^[14]。另外有报道指出,一株威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)脲酶活性不受氮源调节^[31],而同种的其它藻株中 NO_3^- 可下行调节^[32]。因此,氮源对浮游植物脲酶活性的调节作用可能具有种间特异性,有待进一步研究。

最近二、三十年以来,全球尿素的使用量迅速增加,大量尿素进入近岸水体,成为溶解有机氮库的重要组

成成分。越来越多的证据显示,这些来源于人类活动的有机氮可能改变浮游植物群落结构,甚至诱发甲藻赤潮的发生^[4,33]。本研究证实,在无机氮源缺乏的环境条件下,东海原甲藻脲酶活性显著增强,而且与水体尿素浓度呈正相关关系。有理由相信,东海原甲藻对尿素的利用是一种重要的营养竞争策略,使其在无机氮源不足时得以转而利用有机氮源,从而有效拓展营养生态位,在资源竞争中占据有利地位。

参考文献 (References):

- [1] 李荣茂. 福建省沿岸赤潮生物——东海原甲藻生态探讨. 海洋环境科学, 2009, 28(Z1): 65-69.
- [2] 朱德弟, 陆斗定, 王云峰, 苏纪兰. 2005 年春初浙江近海的低温特征及其对大规模东海原甲藻赤潮发生的影响. 海洋学报, 2009, 31(6): 31-39.
- [3] 徐宁, 王萌, 孙凯峰, 胡章喜, 段舜山. 有机氮对大亚湾亚历山大藻种群生长的促进作用. 中国环境科学, 2012, 32(3): 504-509.
- [4] Hu Z, Duan S S, Xu N, Mulholland M R. Growth and nitrogen uptake kinetics in cultured *Prorocentrum donghaiense*. PLoS One, 2014, 9(4): e94030.
- [5] Hu Z X, Mulholland M R, Duan S S, Xu N. Effects of nitrogen supply and its composition on the growth of *Prorocentrum donghaiense*. Harmful Algae, 2012, 13: 72-82.
- [6] 李瑞香, 朱明远, 王宗灵, 石晓勇, 陈炳章. 东海两种赤潮生物种间竞争的围隔实验. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1049-1054.
- [7] 陈炳章, 王宗灵, 朱明远, 李瑞香. 温度、盐度对具齿原甲藻生长的影响及其与中肋骨条藻的比较. 海洋科学进展, 2005, 23(1): 60-64.
- [8] Solomon C M, Collier J L, Berg G M, Glibert P M. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review. Aquatic Microbial Ecology, 2010, 59(1): 67-88.
- [9] Collos Y, Gagne C, Laabir M, Vaquer A, Cecchi P, Souchu P. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) cultures and in Thau Lagoon, southern France. Journal of Phycology, 2004, 40(1): 96-103.
- [10] Kudela R M, Cochlan W P. Nitrogen and carbon uptake kinetics and the influence of irradiance for a red tide bloom off southern California. Aquatic Microbial Ecology, 2000, 21(1): 31-47.
- [11] Glibert P M, Harrison J, Heil C, Seitzinger S. Escalating worldwide use of urea—a global change contributing to coastal eutrophication. Biogeochemistry, 2006, 77(3): 441-463.
- [12] 徐宁, 段舜山, 李爱芬, 刘振乾. 沿岸海域富营养化与赤潮发生的关系. 生态学报, 2005, 25(7): 1782-1787.
- [13] Collos Y, Vaquer A, Laabir M, Abadie E, Laugier T, Pastoureaud A, Souchu P. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, Southern France. Harmful Algae, 2007, 6(6): 781-789.
- [14] Dyhrman S T, Anderson D M. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium*. Limnology and Oceanography, 2003, 48(2): 647-655.
- [15] Harrison P J, Waters R E, Taylor F J R. A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton. Journal of Phycology, 1980, 16(1): 28-35.
- [16] 徐宁, 孙树刚, 段舜山, 李爱芬, 张成武. 海洋微藻脲酶活性测定方法的实验研究. 中国环境科学, 2010, 30(5): 689-693.
- [17] Li Y, Lü S H, Jiang T J, Xiao Y P, You S P. Environmental factors and seasonal dynamics of *Prorocentrum* populations in Nanji Islands National Nature Reserve, East China Sea. Harmful Algae, 2011, 10(5): 426-432.
- [18] 陈翰林, 吕颂辉, 张传松, 朱德弟. 2004 年东海原甲藻赤潮爆发的现场调查和分析. 生态科学, 2006, 25(3): 226-230.
- [19] 王宗灵, 李瑞香, 朱明远, 陈炳章, 郝彦菊. 半连续培养下东海原甲藻和中肋骨条藻种群生长过程与种间竞争研究. 海洋科学进展, 2006, 24(4): 495-503.
- [20] 王金辉, 黄秀清. 具齿原甲藻的生态特征及赤潮成因浅析. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1065-1069.
- [21] Siuda W, Chróst R J. Urea and ureolytic activity in lakes of different trophic status. Polish Journal of Microbiology, 2006, 55(3): 211-225.
- [22] Solomon C M. Regulation of Estuarine Phytoplankton and Bacterial Urea Uptake and Urease Activity by Environmental Factors [D]. Maryland: University of Maryland, College Park, M D, 2006.
- [23] Lomas M W, Glibert P M. Temperature regulation of nitrate uptake: a novel hypothesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms. Limnology and Oceanography, 1999, 44(3): 556-572.
- [24] Fan C L, Glibert P M, Burkholder J A M. Characterization of the affinity for nitrogen, uptake kinetics, and environmental relationships for *Prorocentrum minimum* in natural blooms and laboratory cultures. Harmful Algae, 2003, 2(4): 283-299.
- [25] 孙百晔, 王修林, 李雁宾, 王长友, 王爱军, 梁生康, 张传松. 光照在东海近海东海原甲藻赤潮发生中的作用. 环境科学, 2008, 29(2): 362-367.
- [26] Beckers G, Bendt A K, Krämer R, Burkovski A. Molecular identification of the urea uptake system and transcriptional analysis of urea transporter

- and urease-encoding genes in *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Bacteriology, 2004, 186(22): 7645-7652.
- [27] Cimblaris A C P, Cáceres O. Kinetics of urea uptake by *Melosira italica* (Ehr.) Kütz at different luminosity conditions. Hydrobiologia, 1991, 220(3): 211-216.
- [28] Kuwada Y, Ohta Y. Effect of salinity on hydrogen production and growth of *Lyngbya* sp. Journal of the Faculty of Applied Biological Science, 1994, 30(1): 13-18.
- [29] 钟娜, 杨维东, 刘洁生, 张洁玲, 何洋. 不同氮源对利玛原甲藻 (*Prorocentrum lima*) 生长和产毒的影响. 环境科学学报, 2008, 28(6): 1186-1191.
- [30] Solomon C M, Glibert P M. Urease activity in five phytoplankton species. Aquatic Microbial Ecology, 2008, 52(2): 149-157.
- [31] Peers G S, Milligan A J, Harrison P J. Assay optimization and regulation of urease activity in two marine diatoms. Journal of Phycology, 2000, 36(3): 523-528.
- [32] Lomas M W. Nitrate reductase and urease enzyme activity in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae): interactions among nitrogen substrates. Marine Biology, 2004, 144(1): 37-44.
- [33] 黄凯旋, 张云, 欧林坚, 吕颂辉, 吕淑果, 齐雨藻. 春季海南岛近岸海域尿素与浮游生物的脲酶活性. 生态学报, 2013, 33(15): 4575-4582.