

# 不同氮源、磷源对链状裸甲藻生长与酶活性的影响\*

史竞园<sup>1,3</sup> 刘云<sup>1,2</sup> 张樱馨<sup>1,3</sup> 张绪涛<sup>1,3</sup> 宋书群<sup>1,2</sup> 李才文<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室 山东青岛 266071; 2. 崂山实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 山东青岛 266237; 3. 中国科学院大学 北京 100049; 4. 中国科学院海洋大科学研究中心 山东青岛 266071)

**摘要** 为揭示链状裸甲藻(*Gymnodinium catenatum*)对不同氮源和磷源营养条件的适应机制, 通过在不同营养盐浓度和形态条件下对链状裸甲藻进行一次性培养, 探究了氮源、磷源对链状裸甲藻生长和酶活性的影响。结果显示, 链状裸甲藻可在多种形态氮和磷的条件中生存, 其中链状裸甲藻在氮浓度 0~800  $\mu\text{mol/L}$  范围内对  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的亲合性最高, 在磷浓度 0~32  $\mu\text{mol/L}$  范围内对三磷酸腺苷(ATP) 的利用能力最低。不同氮形态处理组中, 培养初期谷氨酰胺合成酶在  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源的条件中活性表达最强; 培养中后期, 谷氨酰胺合成酶和脲酶在尿素为氮源条件中表达最高, 而各处理组中的硝酸还原酶活性均较低, 表明链状裸甲藻在低硝酸盐环境中没有竞争优势。不同磷形态处理中, 各组碱性磷酸酶活性随培养时间先升高后降低, 酸性磷酸酶活性(除 ATP 处理组外)逐渐降低。ATP 为磷源的处理组具有最高的碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性, 其他三个处理组酶活性表达相似。研究发现不同氮源和磷源显著影响链状裸甲藻的生长, 藻细胞可通过调节谷氨酰胺合成酶、脲酶、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的活性对不同形态营养盐进行利用, 研究结果为阐释链状裸甲藻对复杂营养条件的适应机制及其赤潮发生机制提供了重要参考。

**关键词** 链状裸甲藻; 氮源; 磷源; 藻生长; 酶活性

中图分类号 X55 doi: 10.11693/hyhz20221200334

氮、磷作为许多生物活性物质的主要组成成分, 在海洋生命活动中起着非常重要的作用, 是浮游植物生长的营养盐限制因子(Yamamoto *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015)。海洋中的氮和磷主要以无机态和有机态两种形式存在, 浮游植物可以直接吸收利用无机态营养盐, 也可以通过酶的作用水解有机态营养盐为无机态后再吸收(Oh *et al.*, 2002; 张清春等, 2005)。其中, 参与氮同化的关键酶主要有硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)、谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)和脲酶(urease, UE), 硝酸还原酶参与硝态氮的还原过程, 是藻细胞同化硝氮过程中的第一步; 谷氨酰胺合成酶催化铵氮的转氨基作用从而将铵氮转化为藻细胞可利用的氨基酸; 脲酶是将尿素催化水解转化为氨及氨基甲酸酯的重

要酶, 这三种酶的活性通常被用于评价海洋浮游植物生长状态(Mobley *et al.*, 1989; Iriarte *et al.*, 2005; Berges *et al.*, 2008; 钟娜等, 2008; Solomon *et al.*, 2010)。此外, 浮游植物可以通过碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AkP)水解胞外有机态磷, 酸性磷酸酶(acid phosphatase, AcP)水解胞内磷来同化磷, 维持正常的生命活动(王艳等, 2006; 赵艳芳等, 2009)。

链状裸甲藻(*Gymnodinium catenatum*)隶属于甲藻纲, 裸甲藻目, 裸甲藻科, 裸甲藻属, 是已有报道中唯一一种可产生麻痹性贝类毒素的裸甲藻(Bolch *et al.*, 2002; Cembella *et al.*, 2018)。麻痹性贝类毒素可在食物链中传递, 通过堵塞肌纤维  $\text{Na}^+$ 通道抑制神经传导, 导致动物及人类中毒甚至死亡(Wang *et al.*, 2016)。在中国近海, 链状裸甲藻营养细胞及孢囊分布

\* 国家自然科学基金, 41976136 号; 国家重点研发项目, 2022YFC3105202。史竞园, 博士研究生, E-mail: shijingyuan@qdio.ac.cn  
通信作者: 李才文, 博士生导师, 研究员, E-mail: cwli@qdio.ac.cn  
收稿日期: 2022-12-18, 收修改稿日期: 2023-02-06

广泛(Qi *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 2013), 自 2005 年至今, 共引发赤潮 12 次(中国海洋生态环境状况公报, 2003~2018 年), 其中在 2017 年的福建海域造成严重的中毒事件, 给当地水产养殖业带来巨大的经济损失(陈火荣, 2018; 梁玉波等, 2019)。可见, 链状裸甲藻已成为危害我国近海生态健康与食品安全的常见赤潮藻。

目前, 已有研究表明不同海域的链状裸甲藻藻株生长特性存在差别(Yamamoto *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2005), 而关于我国福建沿海链状裸甲藻藻株的生长特性的研究尚未见报道。因此, 本文通过比较不用形态氮源和磷源对链状裸甲藻生长和相关酶活性的影响, 探究其对不同氮源和磷源的适应性, 为揭示我国近海链状裸甲藻赤潮的发生机制提供参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用链状裸甲藻分离自福建厦门湾, 由国家海洋局第三海洋研究所提供。藻种采用 *f/2+Se* 培养基进行培养(Doblin *et al.*, 2000)。培养温度为(20.0±0.1) °C,

光暗比为 12h : 12h, 光照强度约为 70  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。培养所用海水取自青岛太平湾海域, 盐度为 30.0±0.1, 经 0.22  $\mu\text{m}$  孔径混合纤维膜过滤后, 121 °C 高温灭菌 30 min 后使用。

### 1.2 实验方法

取指数生长期的链状裸甲藻藻液, 按照起始密度为 400 cells/mL 分别接种于 180 mL 的海水中, 饥饿 48 h 用于后续实验。

**1.2.1 生长实验** 不同氮源培养组分别以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、尿素为唯一氮源, 其他元素按照 *f/2+Se* 培养基配方添加。设置 6 个氮浓度: 0、25、50、100、200 和 800  $\mu\text{mol}/\text{L}$  (按氮浓度计)。不同磷源培养组分别以  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、6-磷酸葡萄糖(G-6-P)、 $\beta$ -甘油磷酸( $\beta$ -G-P)和三磷酸腺苷(ATP)为唯一磷源, 其他元素按照 *f/2+Se* 培养基配方添加。设置 6 个磷浓度: 0、2、4、8、16 和 32  $\mu\text{mol}/\text{L}$  (按磷浓度计)。具体实验设置见表 1。每个处理组设置 3 个平行, 每日多次摇晃, 防止藻细胞贴壁下沉。隔日于固定时间取 1 mL 藻液, 经 Lugol's 碘液固定, 在倒置显微镜(SZ61, Olympus, 日本)下对藻细胞进行计数。

表 1 各培养组中的氮、磷形态及浓度  
Tab.1 Species and concentrations of N and P in different treatment groups

形态	氮浓度/ $(\mu\text{mol}/\text{L})$	磷浓度/ $(\mu\text{mol}/\text{L})$
$\text{NaNO}_3$	0、25、50、100、200、800	36
$\text{NaNO}_2$	0、25、50、100、200、800	36
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0、25、50、100、200、800	36
尿素	0、25、50、100、200、800	36
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	883	0、2、4、8、16、32
G-6-P	883	0、2、4、8、16、32
$\beta$ -G-P	883	0、2、4、8、16、32
ATP	883	0、2、4、8、16、32

**1.2.2 酶活实验** 氮源培养组分别以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、尿素为唯一氮源, 设置氮浓度为 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 其他元素按照 *f/2+Se* 培养基配方添加, 每个处理组设置 9 个平行。在第 4、8、12 天取藻液 50 mL, 之后在 4 °C, 3 000 g 下离心 5 min 收集藻细胞, 加入相应试剂盒中缓冲液后于 4 °C 下以 3 m/s 速度匀质化处理 60 s。然后于 4 °C 8 000 r/min 下离心 5 min, 取上清液用于氮相关酶活测定。硝酸还原酶采用硝酸还原酶活性检测试剂盒(索莱宝, 北京)进行测定, 谷氨酰胺合成酶采用谷氨酰胺合成酶试剂盒(科铭生物, 苏州)进行测定; 脲酶采用土壤脲酶试剂盒

(南京建成, 南京)进行测定。测定过程均按照试剂盒说明进行。

磷源培养组分别以  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、G-6-P、 $\beta$ -G-P 和 ATP 为唯一磷源, 设置磷浓度为 32  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 其他元素按照 *f/2+Se* 培养基配方添加, 每个处理组设置 9 个平行。分别于第 4、10、16 天取藻液 50 mL, 之后在 4 °C, 3 000 g 下离心 5 min 收集藻细胞, 加入相应试剂盒中缓冲液后于 4 °C 下以 3 m/s 匀质化处理 60 s。然后于 4 °C 8 000 r/min 下离心 5 min, 取上清液用于碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性测定。两种酶的检测分别使用碱性磷酸酶活性测定试剂盒和酸性磷酸酶活

性测定试剂盒(科铭生物, 苏州)按照说明进行。

### 1.3 数据处理

本研究采用的比生长率( $\mu$ )计算公式为:

$$\mu = \frac{\ln C_n - \ln C_0}{t_n - t_0}, \quad (1)$$

式中,  $\mu$  为链状裸甲藻的比生长率, 单位:  $\text{d}^{-1}$ ;  $C_0$  和  $C_n$  分别为初始  $t_0$  时刻的细胞密度和经过时间  $n$  后  $t_n$  时刻的细胞密度, 单位:  $\text{cells/mL}$ 。

采用米氏方程拟合链状裸甲藻比生长率与营养盐浓度的关系(Monod, 1958):

$$\mu = \frac{\mu_m \times S}{K_\mu + S}, \quad (2)$$

式中,  $\mu$  为链状裸甲藻比生长率, 单位:  $\text{d}^{-1}$ ;  $\mu_m$  为链状裸甲藻最大比生长率, 单位:  $\text{d}^{-1}$ ;  $S$  为初始营养盐浓度, 单位:  $\mu\text{mol/L}$ ;  $K_\mu$  为半饱和常数, 单位:  $\mu\text{mol/L}$ , 其值为  $\mu = \mu_m/2$  时的营养盐浓度。

不同处理组藻最大细胞密度、比生长率及酶活性差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统

计(SPSS 20.0), 采用 Origin Pro 2021 软件对数据进行图表绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同氮源对链状裸甲藻生长的影响

不同氮源对链状裸甲藻生长的影响如图 1 所示。4 种氮源均可促进链状裸甲藻的生长, 但生长状况不同。除  $0 \mu\text{mol/L}$  添加组外, 其余各组藻细胞均在接种后的第 2 天进入指数生长期。以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaNO}_2$  和尿素作为氮源时, 细胞密度均随着初始氮浓度的增加而增加( $P < 0.01$ ), 当浓度为  $800 \mu\text{mol/L}$  时达到最高值, 分别为  $11\ 638$ 、 $10\ 326$  和  $3\ 630 \text{ cells/mL}$ 。而以  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源时, 在氮浓度  $0 \sim 100 \mu\text{mol/L}$  范围内, 细胞密度随初始氮浓度增加而增加,  $100 \mu\text{mol/L}$  时达到最高值  $6\ 000 \text{ cells/mL}$  ( $P < 0.01$ );  $200$  和  $800 \mu\text{mol/L}$  氮添加组的藻细胞在培养开始后迅速下降, 于第 4 天降至  $0 \text{ cells/mL}$ 。

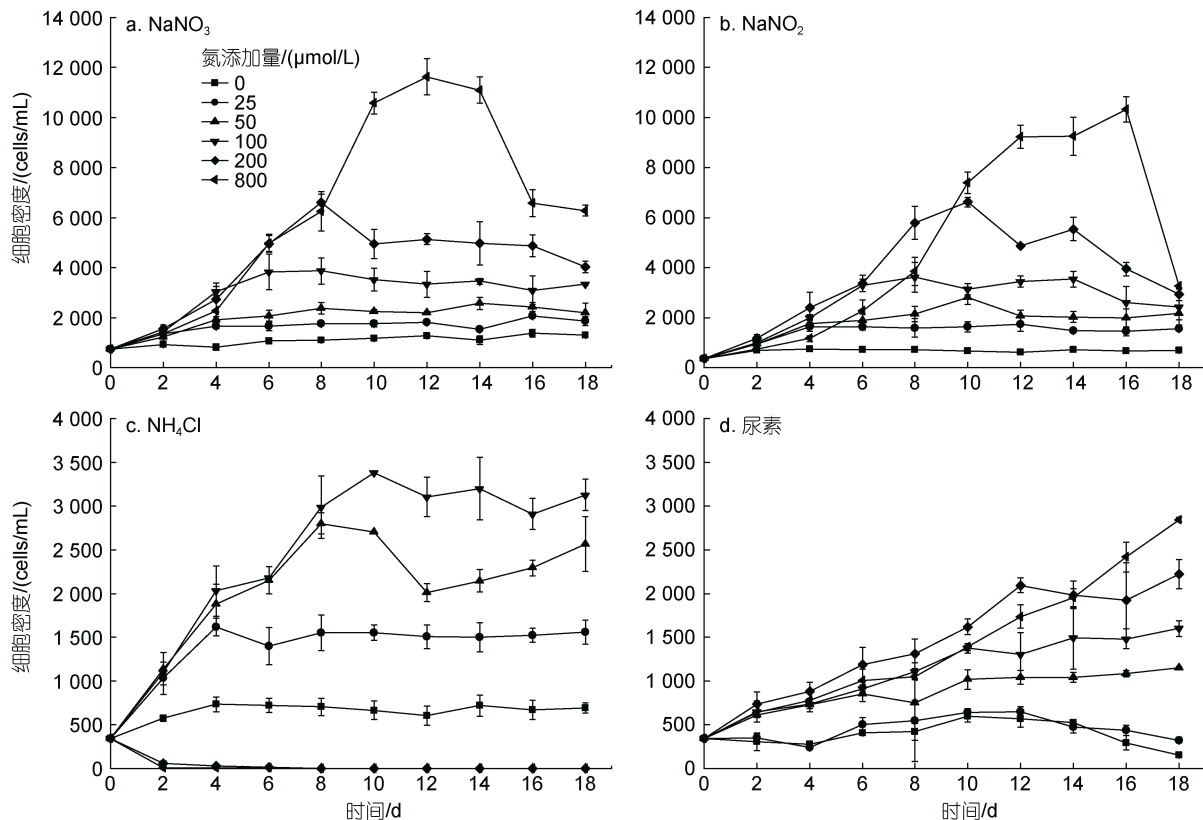


图 1 不同氮形态和浓度条件下链状裸甲藻的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *G. catenatum* in different concentrations of different nitrogen sources

不同氮浓度对链状裸甲藻的比生长率有显著影响。在  $\text{NaNO}_3$  处理组中, 链状裸甲藻的比生长率随初

始氮浓度的增加而增大, 最大为  $0.26 \text{ d}^{-1}$ 。当以  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和尿素作为氮源时, 比生长率在  $0 \sim$

100  $\mu\text{mol/L}$  的范围内随氮浓度的增加而增大, 其最大值出现在  $\text{NaNO}_2$  处理组中为  $0.29 \text{ d}^{-1}$ , 较高氮浓度处理组(200 和 800  $\mu\text{mol/L}$ )中比生长率较低, 分别为  $0.27$  和  $0.25 \text{ d}^{-1}$  ( $\text{NaNO}_2$  处理组),  $0.15$  和  $0.12 \text{ d}^{-1}$  (尿素处理组)。链状裸甲藻的生长符合米氏方程, 拟合结果显示(表 2), 最大比生长率( $\mu_m$ )的范围是  $0.147\sim 0.297 \text{ d}^{-1}$ ,  $\text{NaNO}_3$  处理组最高; 半饱和常数( $K_\mu$ )的范围是  $1.691\sim 23.948 \mu\text{mol/L}$ ,  $\text{NaNO}_2$  处理组最大,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  处理组最小, 偏好系数( $\alpha$ )的最小值为  $0.005$  ( $\text{NaNO}_3$  处理组), 最大值为  $0.118$  ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  处理组)。

表 2 不同氮形态条件下链状裸甲藻的营养吸收动力学参数比较

Tab.2 Growth kinetic parameters of *G. catenatum* grown in different nitrogen sources

氮源	$\mu_m/(\text{d}^{-1})$	$K_\mu/(\mu\text{mol/L})$	$\alpha$	$R^2$
$\text{NaNO}_3$	0.297	59.020	0.005	0.906
$\text{NaNO}_2$	0.292	23.948	0.012	0.870
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.199	1.691	0.118	0.940
尿素	0.147	17.891	0.008	0.856

注:  $\mu_m$  为最大比生长率;  $K_\mu$  为半饱和常数;  $\alpha$  为偏好系数, 等于  $\mu_m$  和  $K_\mu$  的比值;  $R^2$  为拟合优度

## 2.2 不同磷源对链状裸甲藻生长的影响

不同磷源条件下链状裸甲藻的生长如图 2 所示。结果表明, 4 种磷源均可促进链状裸甲藻的生长, 在  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、G-6-P 和 ATP 处理组中,  $0\sim 32 \mu\text{mol/L}$  浓度范围内, 细胞密度均呈现随磷浓度增加而增加的趋势, 其最大细胞密度分别为 11 638、9 353、9 530 cells/mL。当以  $\beta\text{-G-P}$  为磷源时, 细胞密度在磷浓度  $0\sim 16 \mu\text{mol/L}$  的范围内随磷浓度增加而增加,  $32 \mu\text{mol/L}$  处理组最大细胞密度与  $16 \mu\text{mol/L}$  处理组无显著差异( $P>0.05$ )。

不同磷浓度影响链状裸甲藻的比生长率。在  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\beta\text{-G-P}$  处理组中, 链状裸甲藻的比生长率随磷浓度的增加而增加, 在  $32 \mu\text{mol/L}$  组中达到最大值, 分别为  $0.25$  和  $0.28 \text{ d}^{-1}$ ; 以 G-6-P 为磷源时, 比生长率的范围是  $0.04\sim 0.23 \text{ d}^{-1}$ , 其中最大值出现在  $8 \mu\text{mol/L}$  组; 在 ATP 处理组中, 在  $0\sim 16 \mu\text{mol/L}$  范围内比生长率随着磷浓度增加而增大, 最大值为  $0.25 \text{ d}^{-1}$ , 而在  $32 \mu\text{mol/L}$  处理组中略有下降。链状裸甲藻在不同磷处理组中的生长符合米氏方程, 拟合结果(表 3)显示,  $\beta\text{-G-P}$  处理组的  $\mu_m$  值最高, 为  $0.257 \text{ d}^{-1}$ ; G-6-P 处理组的  $\mu_m$  值最低, 为  $0.229 \text{ d}^{-1}$ 。ATP 处理组的半饱和常数

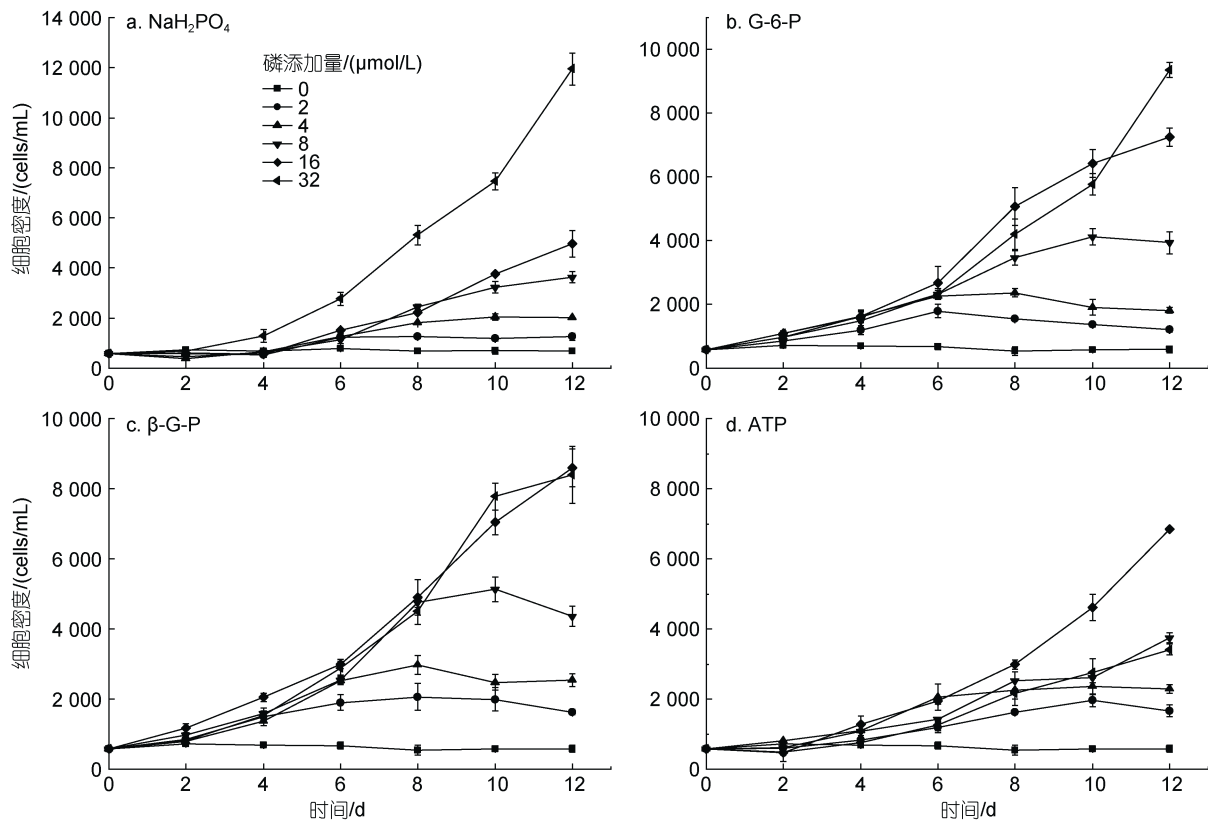


图 2 不同磷形态和浓度条件下链状裸甲藻的生长曲线

Fig.2 Growth curves of *G. catenatum* in different concentrations of different phosphorus sources

表 3 不同磷形态条件下链状裸甲藻的营养吸收动力学参数比较

Table 3 Growth kinetic parameters of *G. catenatum* grown in different phosphorus sources

磷源	$\mu_m/(d^{-1})$	$K_{\mu}/(\mu mol/L)$	$\alpha$	$R^2$
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.230	0.743	0.310	0.880
G-6-P	0.229	0.665	0.344	0.911
$\beta$ -G-P	0.257	0.667	0.385	0.902
ATP	0.243	1.517	0.160	0.850

( $K_{\mu}$ )最大, 为 1.517  $\mu mol/L$ ; G-6-P 处理组的半饱和和常数( $K_{\mu}$ )最小, 为 0.665  $\mu mol/L$ 。偏好系数( $\alpha$ )的最高值出现在  $\beta$ -G-P 处理组为 0.385, 最低值出现在 ATP 处理组为 0.160。

### 2.3 不同氮磷形态对链状裸甲藻酶活的影响

不同氮形态处理组中, 链状裸甲藻谷氨酰胺合成酶、脲酶和硝酸还原酶的酶活性随时间变化如图 3 所示。结果表明, 各组谷氨酰胺合成酶活性变化趋势

相似, 呈现出随着培养时间延长而下降的趋势, 培养第 4 天时, NH<sub>4</sub>Cl 处理组的谷氨酰胺合成酶活性显著高于其他组( $2.42 \times 10^{-6}$  U/cell,  $P < 0.05$ ), 培养第 8 天时, 尿素处理组的酶活性则显著高于其他处理组( $1.64 \times 10^{-6}$  U/cell,  $P < 0.05$ ), 而 NaNO<sub>3</sub> 处理组的酶活性最低( $0.78 \times 10^{-6}$  U/cell), 培养至第 12 天时, 尿素处理组的酶活性依旧显著高于其他组( $1.40 \times 10^{-6}$  U/cell,  $P < 0.05$ ), 而 NH<sub>4</sub>Cl 处理组的酶活性最低( $0.53 \times 10^{-6}$  U/cell)。脲酶活性在 NaNO<sub>2</sub> 和尿素处理组中随培养时间先上升后下降, 而在 NH<sub>4</sub>Cl 和 NaNO<sub>3</sub> 处理组中先下降后上升, 其中在培养第 8 天时, 各组酶活性差异显著( $P < 0.05$ ), 最高值( $795.69 \times 10^{-6}$  U/cell)出现在尿素处理组, 最低值( $150.38 \times 10^{-6}$  U/cell)出现在 NaNO<sub>3</sub> 处理组; 在培养第 12 天时, 尿素处理组的酶活性显著高于其他处理组, 为  $652.09 \times 10^{-6}$  U/cell ( $P < 0.05$ )。实验中, 硝酸还原酶活性介于  $0.08 \times 10^{-8} \sim 2.40 \times 10^{-8}$  U/cell, 各处理组的硝酸还原酶活性无显著差异( $P > 0.05$ )。

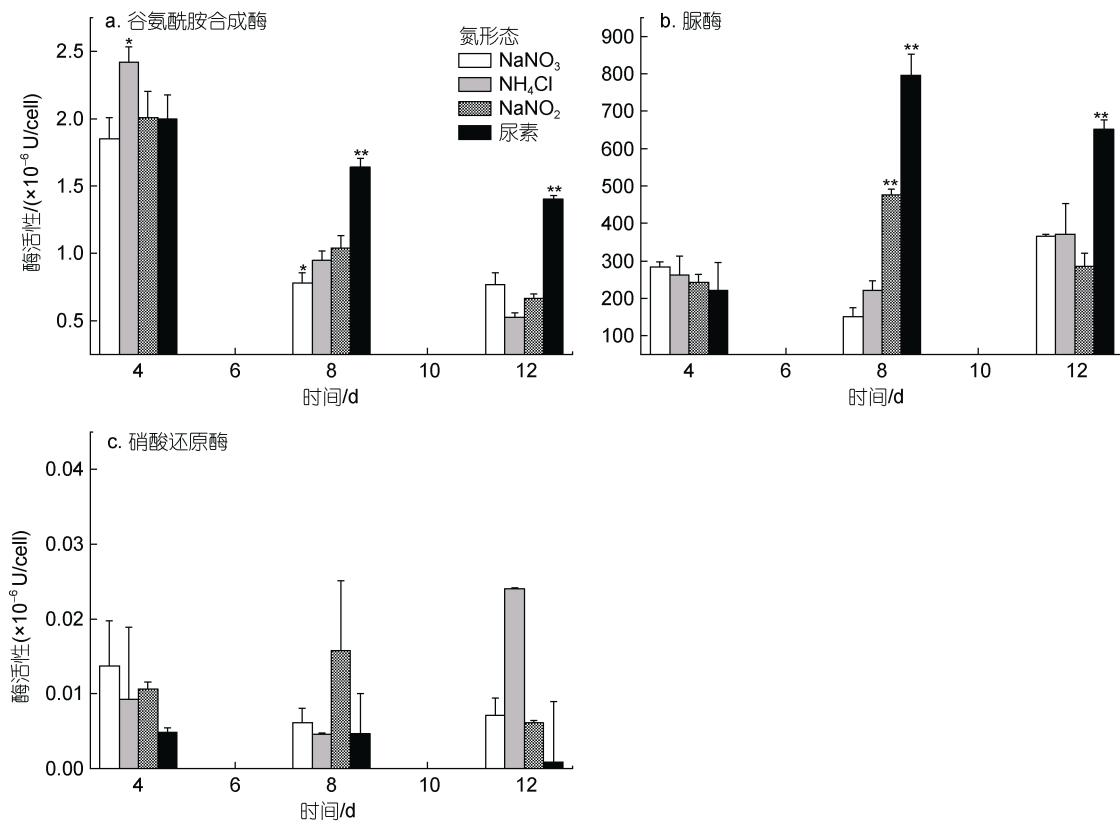


图 3 不同氮源对链状裸甲藻氮同化酶活性的影响

Fig.3 Activity of nitrogen assimilation enzymes in *G.catenatum* in different nitrogen sources

注: 谷氨酰胺合成酶活性定义: 每个细胞在每 mL 反应体系中每小时产生 1  $\mu mol$   $\gamma$ -谷氨酰基异羟肟酸为一个活力单位(U); 脲酶活性定义: 每个细胞每小时产生 1  $\mu g$  NH<sub>3</sub>-N 为一个活力单位(U); 硝酸还原酶活性定义: 每个细胞每小时消耗 1  $\mu mol$  NADH 为一个活力单位(U)。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

在不同磷形态条件下, 链状裸甲藻碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性随培养时间变化如图 4 所示。结果表明, 在不同磷形态处理组中, 链状裸甲藻的碱性磷酸酶活性变化趋势相似, 即藻细胞的碱性磷酸酶活性在生长第 10 天达到最大值, 其中 ATP 处理组的碱性磷酸酶活性最高( $28.92 \times 10^{-6}$  U/cell),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  处理组的碱性磷酸酶活性最低( $11.26 \times 10^{-6}$  U/cell);

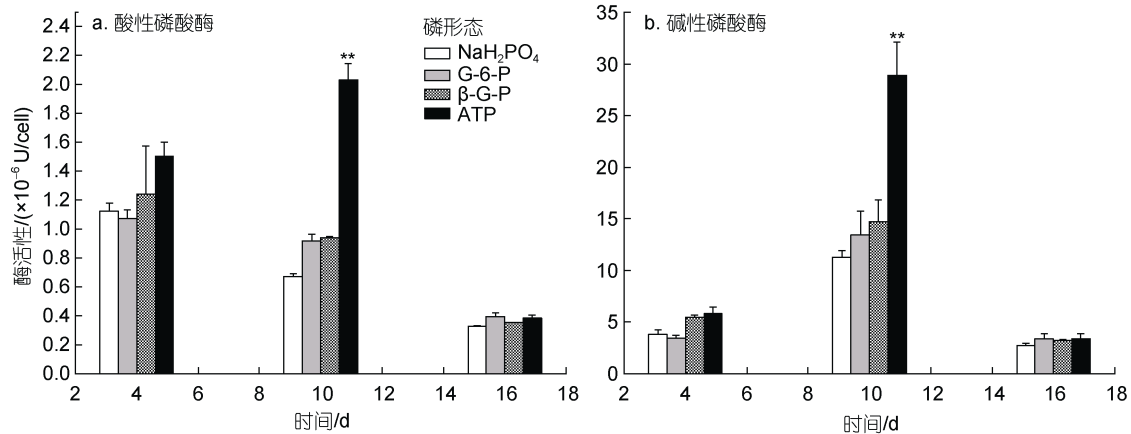


图 4 不同磷源对链状裸甲藻磷同化酶活性的影响

Fig. 4 Activity of phosphorus assimilation enzymes in *G. catenatum* in different phosphorus sources

注: 碱性磷酸酶活性定义:  $20^\circ\text{C}$  中每个细胞每分钟催化产生  $1 \mu\text{mol}$  酚定义为 1 个活力单位(U); 酸性磷酸酶活性定义:  $20^\circ\text{C}$  中每个细胞每分钟催化产生  $1 \mu\text{mol}$  4-硝基苯酚定义为 1 个活力单位(U). \*\* $P < 0.01$

### 3 讨论

#### 3.1 营养盐对链状裸甲藻生长的影响

氮是浮游植物生长的必需元素, 是合成浮游植物细胞结构的必要组分。本研究中链状裸甲藻在以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、尿素为唯一氮源的培养基中均可以生长, 有明显的指数生长期和平台期, 并达到较高细胞密度, 表明链状裸甲藻可以利用  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和尿素作为氮源, 利于其在自然环境中利用不同形态氮源维持正常的生长。当以硝态氮为唯一氮源时, 链状裸甲藻的最大比生长率( $\mu_m$ )是其他处理组  $\mu_m$  的 1.5~2.0 倍, 但是营养吸收动力学结果显示半饱和常数( $K_\mu$ )的大小顺序为  $\text{NaNO}_3 > \text{NaNO}_2 > \text{尿素} > \text{NH}_4\text{Cl}$ , 表明链状裸甲藻对铵盐的亲合性最高(亲和系数  $\alpha$  值=0.118), 该特点与其他藻种类似, 因为与尿素和硝氮相比, 铵氮被转化为氨基酸被利用所需的途径较少, 是消耗能量最低最“经济”的氮源 (Levasseur *et al.*, 1993; Hunter, 2000; 陈建业等, 2014; Liu *et al.*, 2015)。但是, 当培养基中  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度大于  $100 \mu\text{mol/L}$  时, 链状裸甲藻细胞死亡; 因为, 较高浓度  $\text{NH}_4^+$  可转化为  $\text{NH}_3$ , 对藻细胞产生毒害作用, 类似

第 16 天各培养组碱性磷酸酶活性最低。酸性磷酸酶活性在 ATP 处理组中呈现出相似的趋势, 即在第 10 天达到最高值( $2.03 \times 10^{-6}$  U/cell), 第 4 天的活性次之, 第 16 天活性最低。而其余三个处理组中酸性磷酸酶活性的变化趋势则是随培养时间而下降。其中, ATP 处理组的酸性磷酸酶活性显著高于其他三个处理组 ( $P < 0.01$ )。

结果在以往研究中也有报道 (Leong *et al.*, 2004; 李朝霞等, 2010; Liu *et al.*, 2015)。而且, 相似的毒性效应也出现在以尿素和  $\text{NaNO}_2$  为唯一氮源的处理组中,  $800 \mu\text{mol/L}$  处理组的比生长率均低于  $200 \mu\text{mol/L}$  处理组, 且藻密度在第 8 天后快速增长, 可能是此时培养基中的尿素或  $\text{NaNO}_2$  浓度下降, 对藻细胞生长的抑制作用降低 (Taylor *et al.*, 2006; 滕亚娟, 2006; 钟娜等, 2008)。本研究中链状裸甲藻对  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、尿素吸收的半饱和常数( $K_\mu$ )均大于  $10 \mu\text{mol/L}$ , 同时日本海域链状裸甲藻藻株对  $\text{NaNO}_3$  的半饱和常数为  $7.60 \mu\text{mol/L}$ , 均高于很多其他赤潮物种, 表明该藻对这三种氮营养的需求较高, 在低氮浓度的环境中不具备竞争优势 (Yamamoto *et al.*, 2004; 钟娜等, 2008; Liu *et al.*, 2015)。但链状裸甲藻对  $\text{NH}_4^+$  吸收的半饱和常数( $K_\mu$ ,  $1.691 \mu\text{mol/L}$ )低于其他赤潮生物, 如红色赤潮藻 (*Akashiwo sanguinea*,  $3.47 \mu\text{mol/L}$ ), 尖刺拟菱形藻 (*Pseudonitzschia pungens*,  $2.18 \mu\text{mol/L}$ )等, 表明该藻对铵盐的利用优于其他藻种, 铵盐在该藻赤潮形成过程中可能发挥重要作用 (张诚等, 1997; Liu *et al.*, 2015)。

磷也是浮游植物生存所需的主要元素, 是构成某些大分子物质不可缺少的组分 (Xu *et al.*, 2010; Lee

*et al.*, 2012)。本实验结果表明, 4 种磷源均可以促进链状裸甲藻的生长, 证明链状裸甲藻具有与其他浮游藻类类似的利用无机磷和有机磷化合物作为营养物质来源的能力(张清春等, 2005; 赵艳芳等, 2009; 陈建业等, 2014; 于倩等, 2015)。在  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、G-6-P、 $\beta$ -G-P 三种处理组中链状裸甲藻的生长差别不明显, 但在以 ATP 为唯一磷源处理组中, 链状裸甲藻的最大比生长率最低, 且相同磷浓度条件下 ATP 处理组细胞密度始终低于其他处理组, 同时, 营养吸收动力学结果表明 ATP 处理组的半饱和系数最高, 说明链状裸甲藻对 ATP 的亲合性最低, 因此推测链状裸甲藻利用 ATP 的能力弱于其他三种磷源。本实验中链状裸甲藻对磷酸盐吸收的半饱和和常数( $0.743 \mu\text{mol/L}$ )低于许多藻种, 如三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin,  $5.49 \mu\text{mol/L}$ ), 并且高于韩国株系( $2.65 \mu\text{mol/L}$ , Oh *et al.*, 2007), 在福建海域链状裸甲藻赤潮发生期间, 水体中的磷酸盐浓度检出至  $1.465 \mu\text{mol/L}$ , 推测在低浓度磷酸盐水体中, 链状裸甲藻可由于竞争力较强而导致赤潮(樊娟, 2010; 李光毅等, 2022)。

### 3.2 营养盐对链状裸甲藻酶活性的影响

近海水体中氮源形态多种多样, 因此对多种形态氮源的吸收利用对于维持浮游藻类细胞正常生长极为重要。本实验中各处理组中均检测到低水平的硝酸还原酶活性, 说明链状裸甲藻硝酸还原酶存在结构性表达(Mathew, 1981; 钟娜等, 2008; 蒙蕊, 2018)。硝酸还原酶催化硝酸盐还原为亚硝酸盐, 是硝酸盐同化过程中的限速步骤, 从而影响着藻类的生长(Solomonson *et al.*, 1990; 唐洪杰等, 2006)。本研究中, 链状裸甲藻的硝酸还原酶活性最大为  $2.40 \times 10^{-8} \text{ U/cell}$ , 远低于其他藻种的硝酸还原酶活性, 再次说明链状裸甲藻在低氮浓度环境中不具备竞争优势(王金花等, 2008; 王燕, 2011; 丁雁雁, 2012; Liu *et al.*, 2015)。与其他氮源相比,  $\text{NH}_4^+$ 被转化为氨基酸所需的途径较少, 是谷氨酰胺合成酶催化反应的底物, 以  $\text{NH}_4^+$ 为氮源会提高谷氨酰胺合成酶活性表达, 这与之前的研究类似(赵越等, 2003; Forde *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015; 丁光茂, 2018; 蒙蕊, 2018; 江志坚等, 2023)。随着培养时间的延长, 尿素处理组的谷氨酰胺合成酶活性显著高于其他处理组, 这可能是与该藻对尿素的吸收过程有关。藻细胞对不同形态氮源的吸收存在主动吸收和被动吸收两种形式: 对于无机营养盐, 可以通过主动运输的方式在很短时间内大量吸收后再利用; 而对于尿素的吸收过程是被动运输, 需要胞内外的浓度差, 胞内

尿素经脲酶水解利用后浓度下降, 再吸收细胞外的尿素, 因此, 藻细胞对尿素的吸收利用是一个缓慢的过程。本研究中, 培养到第 8 天后, 与其他无机盐处理组相比, 尿素处理组中仍有较高的氮浓度(图 5), 导致谷氨酰胺合成酶活性较高(Carvalho *et al.*, 2004; Collos *et al.*, 2005; Lindehoff *et al.*, 2010)。本研究在 4 种氮源处理组中均检测到脲酶活性, 意味着脲酶是链状裸甲藻的一种组成酶, 可以随时吸收利用水体中的尿素(Antia *et al.*, 1991; Singh, 1991; 蒙蕊等, 2018)。但不同氮源条件下其表达活性仍有所不同, 以尿素为唯一氮源的处理组中脲酶活性显著高于其他处理组( $P < 0.01$ ), 表明脲酶活性受环境中氮源的调控(Dyhrman *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2015; 黄晓云, 2015)。但不同藻种的脲酶活性受外界氮浓度的影响有所不同, 研究发现球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)藻细胞中脲酶活性与硝酸盐浓度呈显著正相关关系, 而野外亚历山大藻(*Alexandrium fundyense*)中脲酶活性随着溶解无机氮浓度而降低, 这种差异在其他藻种中也有发现(Peers *et al.*, 2000; Dyhrman *et al.*, 2003; 蒙蕊, 2018), 可见氮浓度对链状裸甲藻脲酶活性的影响仍需进一步地研究。

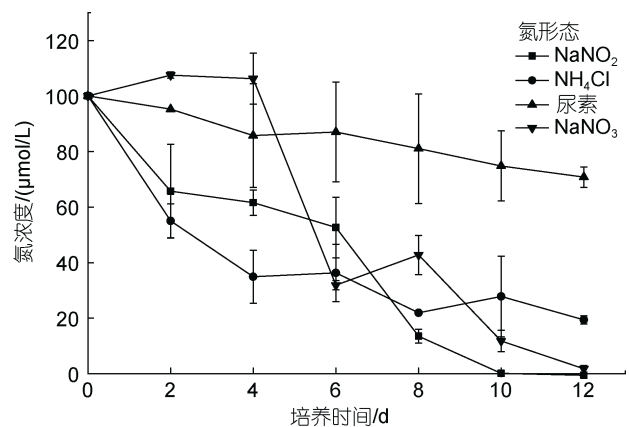


图 5 100  $\mu\text{mol/L}$  浓度不同氮源处理组中氮营养盐浓度变化  
Fig.5 Variations of nitrogen concentration in different nitrogen sources at 100  $\mu\text{mol/L}$

海洋中磷源多种多样, 许多藻种都具有利用多种含磷化合物的能力。研究表明, 在无机磷缺失的环境中, 藻细胞可以通过诱导合成碱性磷酸酶分解水体中的有机磷, 或者通过酸性磷酸酶水解胞内储存的多聚磷酸盐, 来供藻类维持生长(黄邦钦等, 1999; Hernández *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2014)。本研究中, 培养初期, 各处理组藻细胞内可能仍有部分储存的多聚磷酸盐供藻类维持生长, 此时酸性磷酸酶活性处

于高点; 随着培养的进行, 胞内磷酸盐逐渐降低, 酸性磷酸酶活性下降, 而碱性磷酸酶活性升高, 用于分解胞外可利用的有机磷。培养末期, 两种酶的活性均降到了低值, 推测是由于胞外和胞内的磷营养都被耗尽, 这种酶活性随培养时间的变化与之前的研究类似(Oh *et al.*, 2002; 张清春等, 2005; 杨维东等, 2008; Bai *et al.*, 2014; 于倩等, 2015)。其中, 无机磷处理组的碱性磷酸酶活性始终低于其他有机磷处理组, Oh 等(2002)的研究结果也表明外界较高的  $\text{H}_2\text{PO}_4$  浓度会抑制碱性磷酸酶活性的表达, 当外界无机营养盐浓度降低时细胞内碱性磷酸酶活性会迅速上升, Oh 等(2002)也发现外界磷酸盐浓度降低会诱导链状裸甲藻细胞内碱性磷酸酶活性上升。目前, 关于浮游植物对有机磷的利用途径有 2 种猜想: 一种是被直接吸收利用的小分子有机磷, 如 G-6-P; 另一种是需经碱性磷酸酶等水解作用后才能被吸收利用的较大分子有机磷, 如蛋黄卵磷脂(Bentzen *et al.*, 1991; 洪华生等, 1992; 黄邦钦等, 1999; 邹迪等, 2005)。本研究中, G-6-P 和  $\beta$ -G-P 虽然是有机磷, 但是这两个处理组碱性磷酸酶活性大小与无机磷处理组无显著差异, 推测这两种有机磷可能无需通过酶解作用而被直接吸收利用; 而在第 10 天时 ATP 处理组的碱性磷酸酶活性是其他处理组的 2 倍, 因此推测链状裸甲藻可能并不是直接吸收 ATP, 而是经由碱性磷酸酶或者 5'核苷酸酶水解成为无机磷后才可被细胞吸收利用(王艳等, 2006; 杨维东等, 2008)。

#### 4 结论

(1) 链状裸甲藻在以  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、尿素为唯一氮源的水体中均可生长, 但对  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的亲合性最高, 高浓度的  $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、尿素对藻细胞有毒性效应。

(2) 链状裸甲藻在以  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、G-6-P、 $\beta$ -G-P 和 ATP 为唯一磷源的水体中均可生长, 但对 ATP 的利用效率最低。

(3) 链状裸甲藻中硝酸还原酶是结构性表达且活性较低, 导致链状裸甲藻在低氮环境中不具备竞争优势; 谷氨酰胺合成酶和脲酶的活性分别受其铵盐、尿素底物的诱导而增高; 链状裸甲藻对尿素的缓慢吸收可能导致培养后期谷氨酰胺合成酶的活性高于无机氮培养组。

(4) 链状裸甲藻可通过提高碱性磷酸酶活性水解环境中的有机磷, 满足藻细胞对磷的需求; 链状裸

甲藻细胞对小分子有机磷 G-6-P、 $\beta$ -G-P 的吸收利用可能并不需要碱性磷酸酶的参与, ATP 为磷源时可诱导藻细胞产生较高的碱性磷酸酶活性。

#### 参 考 文 献

- 丁光茂, 2018. 链状亚历山大藻谷氨酰胺合成酶的分离纯化及酶学特性研究[J]. 渔业研究, 40(2): 98-103.
- 丁雁雁, 2012. 温度、光照对东海几种典型赤潮藻生长及硝酸还原酶活性的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学.
- 于倩, 王清, 袁泽轶, 等, 2015. 不同形态磷源对具槽帕拉藻 (*Paralia sulcata*) 生长和磷酸酶活性的影响[J]. 海洋与湖沼, 46(5): 1018-1023.
- 王金花, 唐洪杰, 王修林, 等, 2008. 氮、磷营养盐对东海原甲藻生长和硝酸还原酶活性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 14(5): 620-623.
- 王艳, 唐海溶, 2006. 不同形态的磷源对球形棕囊藻生长及碱性磷酸酶的影响[J]. 生态科学, 25(1): 38-40.
- 王燕, 2011. 海洋浮游植物细胞体积与细胞碳、氮及叶绿素 *a* 含量之间的关系[D]. 青岛: 中国海洋大学.
- 江志坚, PREMARATHNE C I, 方扬, 等, 2023. 铵态氮加富对贝克喜盐草光合作用、谷氨酰胺合成酶和氨基酸成分的影响[J]. 热带海洋学报, 42(3): 116-125.
- 李光毅, 刘保清, 邱勇, 等, 2022. 链状裸甲藻赤潮消亡过程及其与休眠包囊关系的初步研究[J]. 海洋学报, 44(8): 123-132.
- 李朝霞, 刘升平, 2010. 施用不同氮源对球等鞭金藻 3011 生长的影响[J]. 中国农学通报, 26(1): 303-307.
- 杨维东, 钟娜, 刘洁生, 等, 2008. 不同磷源及浓度对利玛原甲藻生长和产毒的影响研究[J]. 环境科学, 29(10): 2760-2765.
- 邹迪, 肖琳, 杨柳燕, 等, 2005. 不同氮磷比对铜绿微囊藻及附生假单胞菌磷代谢的影响[J]. 环境化学, 24(6): 647-650.
- 张诚, 邹景忠, 1997. 尖刺拟菱形藻氮磷吸收动力学以及氮磷限制下的增殖特征[J]. 海洋与湖沼, 28(6): 599-603.
- 张清春, 于仁诚, 周名江, 等, 2005. 不同类型含磷营养物质对微小亚历山大藻 (*Alexandrium minutum*) 生长和毒素产生的影响[J]. 海洋与湖沼, 36(5): 465-474.
- 陈火荣, 2018. 2017 年福建海域链状裸甲藻赤潮事件应急处置与思考[J]. 渔业研究, 40(4): 308-314.
- 陈建业, 林丹, 黄健, 等, 2014. 不同氮源、磷源营养盐对亚心型扁藻 (*Platymonius subcordiformis*) 生长的影响[J]. 福建水产, 36(4): 258-263.
- 赵艳芳, 俞志明, 宋秀贤, 等, 2009. 不同磷源形态对中肋骨条藻和东海原甲藻生长及磷酸酶活性的影响[J]. 环境科学, 30(3): 693-699.
- 赵越, 魏自民, 马凤鸣, 2003. 不同水平铵态氮对甜菜硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶活力的影响[J]. 中国糖料(1): 22-25.
- 钟娜, 杨维东, 刘洁生, 等, 2008. 不同氮源对利玛原甲藻 (*Prorocentrum lima*) 生长和产毒的影响[J]. 环境科学学报, 28(6): 1186-1191.
- 洪华生, 戴民汉, 郑效成, 1992. 海水中碱性磷酸酶活力的测定及其在磷的循环中的作用初探[J]. 海洋与湖沼, 23(4): 415-420.
- 唐洪杰, 王金花, 祝陈坚, 等, 2006. 几种海洋微藻硝酸还原酶特性的初步研究[J]. 海洋水产研究, 27(6): 48-54.



- 黄邦钦, 黄世玉, 翁妍, 等, 1999. 溶解态磷在海洋微藻碱性磷酸酶活力变化中的调控作用[J]. 海洋学报, 21(1): 55-60.
- 黄晓云, 2015. 五种浮游植物的脲酶生理学特性的研究[D]. 广州: 暨南大学.
- 梁玉波, 李冬梅, 姚敬元, 等, 2019. 中国近海藻毒素及有毒微藻产毒原因种调查研究进展[J]. 海洋与湖沼, 50(3): 511-524.
- 蒙蕊, 2018. 典型赤潮微藻对不同氮源的响应机制研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所).
- 蒙蕊, 宋秀贤, 刘淑雅, 等, 2018. 球形棕囊藻对不同氮源的吸收利用机制[J]. 海洋与湖沼, 49(4): 802-808.
- 樊娟, 2010. 氮、磷浓度及氮输入频度对两种海洋微藻生长的影响研究[D]. 天津: 南开大学.
- 滕亚娟, 2006. 不同氮源对骨条藻生长的影响[J]. 水利渔业, 26(4): 55-56, 109.
- ANTIA N J, HARRISON P J, OLIVEIRA L, 1991. The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology [J]. Phycologia, 30(1): 1-89.
- BAI F, LIU R, YANG Y J, *et al*, 2014. Dissolved organic phosphorus use by the invasive freshwater diazotroph cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* [J]. Harmful Algae, 39: 112-120.
- BENTZEN E, TAYLOR W D, 1991. Estimating organic P utilization by freshwater plankton using [<sup>32</sup>P]ATP [J]. Journal of Plankton Research, 13(6): 1223-1238.
- BERGES J A, MULHOLLAND M R, 2008. Enzymes and nitrogen cycling [M]// CAPONE D G, BRONK D A, MULHOLLAND M R, *et al*. Nitrogen in the Marine Environment. 2nd ed. Massachusetts, USA: Academic Press: 1385-1444.
- BOLCH C J S, NEGRI A P, BLACKBURN S I, *et al*, 2002. Life cycle variation in PST content and cell toxicity in PST-producing dinoflagellates [C] // Lifehab: Life History of Microalgal Species Causing Harmful Blooms. Santa Ponca, Spain.
- CARVALHO J C M, FRANCISCO F R, ALMEIDA K A, *et al*, 2004. Cultivation of *Arthrospira (spirulina) platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates [J]. Journal of Phycology, 40(3): 589-597.
- CEMBELLA A D, BAND-SCHMIDT C J, 2018. Harmful algal species fact sheet: *Gymnodinium catenatum* [M] // SHUMWAY S E, BURKHOLDER J M, MORTON S L. Harmful Algal Blooms: A Compendium Desk Reference. Singapore: John Wiley & Sons Ltd: 605-612.
- COLLOS Y, VAQUER A, SOUCHU P, 2005. Acclimation of nitrate uptake by phytoplankton to high substrate levels [J]. Journal of Phycology, 41(3): 466-478.
- DOBLIN M A, BLACKBURN S I, HALLEGRAEFF G M, 2000. Intraspecific variation in the selenium requirement of different geographic strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* [J]. Journal of Plankton Research, 22(3): 421-432.
- DYHRMAN S T, ANDERSON D M, 2003. Urease activity in cultures and field populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium* [J]. Limnology and Oceanography, 48(2): 647-655.
- 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* [J]. Marine Biology, 142(5): 949-958.
- FORDE B G, LEA P J, 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling [J]. Journal of Experimental Botany, 58(9): 2339-2358.
- GU H F, LIU T T, VALE P, *et al*, 2013. Morphology, phylogeny and toxin profiles of *Gymnodinium inusitatum* sp. nov., *Gymnodinium catenatum* and *Gymnodinium microreticulatum* (Dinophyceae) from the Yellow Sea, China [J]. Harmful Algae, 28: 97-107.
- HERNÁNDEZ I, NIELL F X, WHITTON B A, 2002. Phosphatase activity of benthic marine algae. An overview [J]. Journal of Applied Phycology, 14(6): 475-487.
- HUNTER J R, 2000. Huon estuary study-environmental research for integrated catchment management and aquaculture [R]. Hobart: CSIRO Marine Research, Marine Laboratories.
- IRIARTE J L, QUIÑONES R A, GONZÁLEZ R R, 2005. Relationship between biomass and enzymatic activity of a bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae) in southern Chile (41°S): a field approach [J]. Journal of Plankton Research, 27(2): 159-166.
- LEE T C H, KWOK O T, HO K C, *et al*, 2012. Effects of different nitrate and phosphate concentrations on the growth and toxin production of an *Alexandrium tamarense* strain collected from Drake Passage [J]. Marine Environmental Research, 81: 62-69.
- LEONG S C Y, TAGUCHI S, 2004. Response of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* to a range of nitrogen sources and concentrations: growth rate, chemical carbon and nitrogen, and pigments [J]. Hydrobiologia, 515(1/2/3): 215-224.
- LEVASSEUR M, THOMPSON P A, HARRISON P J, 1993. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources [J]. Journal of Phycology, 29(5): 587-595.
- LIM P T, OGATA T, 2005. Salinity effect on growth and toxin production of four tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae) [J]. Toxicon, 45(6): 699-710.
- LINDEHOFF E, GRANÉLI E, GLIBERT P M, 2010. Influence of prey and nutritional status on the rate of nitrogen uptake by *Prymnesium parvum* (haptophyte) [J]. Journal of the American Water Resources Association, 46(1): 121-132.
- LIU Y, CHEN T T, SONG S Q, *et al*, 2015. Effects of nitrogenous nutrition on growth and nitrogen assimilation enzymes of dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* [J]. Harmful Algae, 50: 99-106.
- MATHEW T, 1981. Nitrate reduction in Chlorococcales [J]. Hydrobiologia, 79(1): 3-14.
- MOBLEY H L, HAUSINGER R P, 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization [J]. Microbiological Reviews, 53(1): 85-108.
- MONOD J, 1942. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes [M]. 2nd ed. Hermann et Cie, Paris: 211.
- OH S J, YAMAMOTO T, KATAOKA Y, *et al*, 2002. Utilization of dissolved organic phosphorus by the two toxic dinoflagellates, *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium catenatum*

- (Dinophyceae) [J]. *Fisheries Science*, 68(2): 416-424.
- OH S J, YOON Y H, YANG H S, 2007. Growth and phosphate uptake of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Yeosuhae Bay, South Korea [J]. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(2): 95-101.
- PEERS G S, MILLIGAN A J, HARRISON P J, 2000. Assay optimization and regulation of urease activity in two marine diatoms [J]. *Journal of Phycology*, 36(3): 523-528.
- QI Y Z, HONG Y, ZHENG L, *et al*, 1996. Dinoflagellate cysts from recent marine sediments of the South and East China Seas [J]. *Asian Marine Biology*, 13: 87-103.
- SINGH S, 1991. Regulation of growth in a diazotrophic cyanobacterium *Anabaena doliolum* by nitrogen sources [J]. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 57(3B-4B): 271-276.
- 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 [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 59(1): 67-88.
- SOLOMONSON L P, BARBER M J, 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41: 225-253.
- TAYLOR G T, GOBLER C J, SAÑUDO-WILHELMY S A, 2006. Speciation and concentrations of dissolved nitrogen as determinants of brown tide *Aureococcus anophagefferens* bloom initiation [J]. *Marine Ecology Progress*, 312: 67-83.
- WANG D Z, ZHANG S F, ZHANG Y, *et al*, 2016. Paralytic shellfish toxin biosynthesis in cyanobacteria and dinoflagellates: a molecular overview [J]. *Journal of Proteomics*, 135: 132-140.
- XU S S, SONG J M, LI X G, *et al*, 2010. Changes in nitrogen and phosphorus and their effects on phytoplankton in the Bohai Sea [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 28(4): 945-952.
- YAMAMOTO T, OH S J, KATAOKA Y, 2002. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan [J]. *Fisheries Science*, 68(2): 356-363.
- YAMAMOTO T, OH S J, KATAOKA Y, 2004. Growth and uptake kinetics for nitrate, ammonium and phosphate by the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Hiroshima Bay, Japan [J]. *Fisheries Science*, 70(1): 108-115.

## EFFECTS OF NITROGEN AND PHOSPHORUS SOURCES ON GROWTH AND ASSIMILATION ENZYMES OF DINOFLAGELLATE *GYMNODINIUM CATENATUM*

SHI Jing-Yuan<sup>1,3</sup>, LIU Yun<sup>1,2</sup>, ZHANG Ying-Xin<sup>1,3</sup>, ZHANG Xu-Tao<sup>1,3</sup>,  
SONG Shu-Qun<sup>1,2</sup>, LI Cai-Wen<sup>1,2,3,4</sup>

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Marine Ecology and Environmental Science laboratory, Laoshan Laboratory, Qingdao 266237, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract** To classify the adaption mechanism of *Gymnodinium catenatum* to nitrogen and phosphorus, a batch culture of *G. catenatum* was carried out in different sources (species) of nitrogen and phosphorus. *G. catenatum* was able to grow well on multiple N and P substrates within appropriate ranges of concentrations. The dinoflagellate showed the greatest affinity to  $\text{NH}_4^+$  in the nitrogen concentration of 0~800  $\mu\text{mol/L}$ , while the lowest capacity for utilizing ATP (adenosine triphosphate) in the phosphorus concentration of 0~32  $\mu\text{mol/L}$ . At the early stage of the growth, the glutamine synthetase activity was the highest when grown on  $\text{NH}_4^+$ . Along with the growth of *G. catenatum*, both glutamine synthetase and urease were induced by urea. Additionally, the activity of nitrate reductase was extremely low, indicating its competitive weakness in the nitrate-deplete environment. In all P treatments, the alkaline phosphatase activity increased with time and then decreased, while the acid phosphatase activity (except ATP treatment) decreased. Both enzymes expressed the highest activity when grown on ATP and showed similar activity among other three P sources. Results indicate that different nitrogen and phosphorus species had significant effects on the growth of *G. catenatum*. The dinoflagellate could regulate the activity of glutamine synthetase, urease, alkaline phosphatase, and acid phosphatase to assimilate different types of nutrients. This study provided a reference for revealing the adaptation mechanism of *G. catenatum* to different nutrients, and promoted fundamental knowledge regarding the formation mechanism of *G. catenatum* blooms along the coast of China.

**Key words** *Gymnodinium catenatum*; nitrogen; phosphorus; growth; enzyme activity