

# 温度对旋链角毛藻 (*Chaetoceros curvisetus*) 和米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*) 生长及硝酸还原酶活力的影响<sup>\*</sup>

戴爱泉<sup>1, 2)</sup> 石晓勇<sup>3, 1, 2)</sup> 丁雁雁<sup>1, 2)</sup> 唐洪杰<sup>1, 2)\*\*</sup> 王丽莎<sup>1, 2)</sup> 王修林<sup>1, 2)</sup>

(<sup>1)</sup> 中国海洋大学化学化工学院, 青岛 266100; (<sup>2)</sup> 中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 青岛 266100;

(<sup>3)</sup> 国家海洋局海洋减灾中心, 北京 100194)

**摘要** 选用东海常见的两种赤潮肇事藻种: 旋链角毛藻和米氏凯伦藻, 采用一次性培养实验, 研究了不同温度对两种赤潮藻生长及硝酸还原酶活力(NRA)的影响。研究结果表明, 在 10℃~30℃ 条件下旋链角毛藻均能正常生长, 且生长曲线均符合 S-logistic2 种群增长模型; 而米氏凯伦藻在 10℃ 和 30℃ 条件下不能正常生长, 在其他温度条件下生长情况与旋链角毛藻相似。温度适宜时, 两种藻的硝酸还原酶活力最大值(NRA<sub>max</sub>)、最大生长速率( $\mu_{max}$ )和终止生物量( $B_t$ )随温度的变化趋势基本一致, 说明温度的高低可通过影响细胞硝酸还原酶活力大小间接影响藻类的生长。旋链角毛藻单位体积的 NRA<sub>max</sub> 和最大生长速率均大于米氏凯伦藻, 说明旋链角毛藻能够更好地吸收利用硝酸盐。

**关键词** 旋链角毛藻, 米氏凯伦藻, 硝酸还原酶活力, 温度, 最大生长速率

**学科分类号** Q5, Q176, Q26, Q89

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00465

近年来, 我国东海尤其是长江口及浙江沿岸连年爆发硅藻、甲藻交替的赤潮现象<sup>[1-4]</sup>, 给海洋经济的发展带来了严重的影响<sup>[5]</sup>。但赤潮发生因素众多、发生机理复杂, 到目前为止赤潮发生机理仍未得到明确解释。相关研究表明, 除外界营养物质供应充足外, 温度的影响在赤潮发生过程中起到至关重要的作用<sup>[6-7]</sup>。

生物的生长离不开对营养物质的吸收转化, 其中氮是海洋植物生长发育不可缺少的营养元素<sup>[8-9]</sup>。硝酸盐经浮游植物吸收后, 并不能直接得到利用, 需要在体内经过硝酸还原酶等一系列酶的作用<sup>[10]</sup>, 最终转化成氨氮并合成其他有机物质。其中广泛存在于浮游植物体内的硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)作为控制植物体内生物氮循环的首要诱导酶<sup>[11-12]</sup>, 其活力的高低可以反映植株(高等植物或浮游植物)氮素的营养状况和氮的代谢水平<sup>[13-16]</sup>。但是硝酸还原酶作为一种底物诱导酶, 其半衰期约为数小时<sup>[17]</sup>, 且极易受到多种外界环境因素(如温度等)的影响<sup>[18-19]</sup>, 从而影响浮游植物的生长。目前, 关

于温度对硝酸还原酶活力(NRA)的影响多集中在维管植物<sup>[20]</sup>或植物的某一组织中<sup>[21]</sup>, 少见生长温度的不同对海洋微藻硝酸还原酶活力影响的报道。研究温度对微藻硝酸还原酶的影响, 以及在不同培养温度下藻的 NRA 与生物量变化之间的关系, 可以从生理指标角度解释赤潮生消的机理及规律, 为赤潮的预警和防范提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验藻种

实验选择东海赤潮高发区常见的两种主要赤潮肇事藻, 其中旋链角毛藻(*Chaetoceros curvisetus*, *C. curvisetus*)隶属于硅藻门, 米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*, *K. mikimotoi*)隶属于甲藻门。藻种均由中

<sup>\*</sup> 国家重点基础研究发展计划(973)(2010CB428701)资助项目。

<sup>\*\*</sup> 通讯联系人。

Tel: 0532-66786617, E-mail: thjie@ouc.edu.cn

收稿日期: 2014-02-25, 接受日期: 2014-04-10

国海洋大学海洋污染生态化学实验室藻种室提供。

## 1.2 实验设计

初始营养盐浓度(N 32  $\mu\text{mol/L}$ , P 1.5  $\mu\text{mol/L}$ , Si 32  $\mu\text{mol/L}$ , 微量元素和维生素浓度同 f/2)相同, 自然最大光强下, 设置 5 个温度梯度(10 $^{\circ}\text{C}$ 、15 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ ), 温控精度 0.6 $^{\circ}\text{C}$ ~1 $^{\circ}\text{C}$ , 每组设置 3 个平行样。

## 1.3 实验方法

藻种在用过滤灭菌后的海水配制的 f/2 培养基中培养(参照东海赤潮发生时的现场营养盐浓度), 并于不同光照和温度下驯化到指数生长期, 随后接种到 5 L 的对苯二甲酸乙二酯(PET)桶, 培养液体积约为 4.5 L, 于上述 5 个温度条件下培养。初始接种藻密度均在  $10^3 \text{ cells}\cdot\text{ml}^{-1}$  左右。每天于上午 8:00 取样测定当天藻细胞的硝酸还原酶活力及藻密度计数。

## 1.4 样品测定方法及数据处理

### 1.4.1 硝酸还原酶活力测定及藻密度计数方法

硝酸还原酶的提取及其活力(NRA)测定参考 Berges 等<sup>[22]</sup>和唐洪杰等<sup>[23]</sup>的方法进行。将培养液通过 Whatman GF/F 玻璃纤维膜减压过滤收集藻细胞。于样品中加入 1 ml 提取缓冲液后, 使用玻璃匀浆器在 4 $^{\circ}\text{C}$  温度下破碎藻细胞, 并于 12 000 r/min 离心 5 min, 取其上清液 300  $\mu\text{l}$  用于酶促反应, 反应液终体积为 1 ml, 30 min 后加入 2 ml 550 mmol/L 的醋酸锌溶液终止反应, 离心取上清液添加 PMS 溶液, 并在 30 $^{\circ}\text{C}$  温度下氧化 20 min 后加入磺胺- $\alpha$ -萘乙二胺显色剂显色 15 min, 用紫外-可见分光光度计于 540 nm 下测定吸光值( $A_{540}$ ), 最终硝酸还原酶活力(NRA)表征为单个细胞在单位时间内产生的  $\text{NO}_2\text{-N}$  的量, 其单位为  $\text{fmol}\cdot\text{min}^{-1}$ , 结果为 3 个平行样的平均值。藻密度采用显微镜目视计数法进行计数。

### 1.4.2 终止生物量 $B_f$ 及最大生长速率 $\mu_{\max}$ 的计算

根据 S-logistic2 种群增长模型公式进行非线性拟合<sup>[24]</sup>, 得到不同温度条件下藻细胞生长状态表征参数  $\mu_{\max}$  和  $B_f$ , 模型方程形式如下:

$$B_t = \frac{B_f}{1 + \frac{B_f - B_0}{B_0} \cdot \exp\left(-\frac{4\mu_{\max}}{B_f} \cdot t\right)}$$

式中:  $\mu_{\max}$  为藻细胞最大生长速率( $\text{ml}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),  $B_0$  表示初始藻细胞密度( $\text{ml}^{-1}$ ),  $B_f$  为终止时刻藻细胞密度( $\text{ml}^{-1}$ ),  $B_t$  为  $t(\text{d})$ 时刻藻细胞密度( $\text{ml}^{-1}$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 温度对旋链角毛藻生长及 NRA 的影响

初始营养盐浓度和光照相同, 不同温度条件下培养旋链角毛藻, 其各培养组的藻细胞 NRA 以及藻细胞密度变化随培养时间的变化趋势见图 1。在实验设定的 5 个不同温度条件下, 随培养的进行, 旋链角毛藻的藻密度基本呈现出相似的规律, 即该藻在经历了极短的生长迟滞期后于接种的第 2 天或第 3 天进入指数生长阶段, 且指数生长阶段持续 5~7d; 藻 NRA 随培养时间变化曲线的趋势也基本一致, 呈现出慢升快降的不对称倒“V”型曲线。

具体而言, 在本实验设定的最低温度 10 $^{\circ}\text{C}$  下, 旋链角毛藻生长缓慢, 藻密度最大值出现在接种后的第 8 天( $5.5\times 10^3/\text{ml}$ ), 仅为接种时藻细胞密度的 1.8 倍, 当培养温度增至 15 $^{\circ}\text{C}$  时, 指数生长期开始于接种后的第 2 天, 至第 9 天藻细胞密度达到最大, 指数生长期持续近 8d, 旋链角毛藻生长情况明显优于 10 $^{\circ}\text{C}$ , 其最大藻细胞密度是 10 $^{\circ}\text{C}$  时的近 4 倍, 当温度达到 20 $^{\circ}\text{C}$  时, 旋链角毛藻生长最为旺盛, 最大藻密度约为 10 $^{\circ}\text{C}$  时的 8 倍, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$  藻生长曲线及最大藻密度与 15 $^{\circ}\text{C}$  时相类似。本实验结果显示旋链角毛藻在 10 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$  条件下均能正常生长, 其最适生长温度约为 20 $^{\circ}\text{C}$ , 与茅华等<sup>[25]</sup>的研究结果一致。

各温度条件下, 所有实验组自接种后 NRA 均持续增大, 且在接种后 2~3d 达到最大值。至 8d 之后, NRA 值较低并已基本恒定。由于硝酸还原酶的半衰期较短<sup>[17]</sup>, 同时硝酸还原酶的表达量会明显受到培养液中硝酸盐含量的影响<sup>[26]</sup>, 随着培养的进行, 藻细胞数量持续增加, 硝酸盐大量消耗, 同时细胞体内亚硝酸盐大量累积<sup>[27]</sup>, 可以推测在培养过程中由于细胞中硝酸还原酶表达量发生了变化, 从而造成了硝酸还原酶活力值的变化, 这尚需后续的研究加以证实。同时, 所有实验组生物量最大值均出现在  $\text{NRA}_{\max}$  出现的 5~6d, 说明旋链角毛藻的生长滞后于  $\text{NRA}_{\max}$  出现。

进一步分析表明, 实验条件下, 旋链角毛藻的  $\text{NRA}_{\max}$ 、 $\mu_{\max}$  及  $B_f$  随温度的变化趋势基本一致(图 2), 即在 10 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$  的温度范围内,  $\text{NRA}_{\max}$ 、 $\mu_{\max}$  及  $B_f$  均表现出随温度的升高先增大后降低的变化趋势, 其极大值均出现在 20 $^{\circ}\text{C}$ 。 $\text{NRA}_{\max}$ 、 $\mu_{\max}$  及  $B_f$  的温度效应顺序基本符合 20 $^{\circ}\text{C}$  > 25 $^{\circ}\text{C}$  ~ 30 $^{\circ}\text{C}$  >

15℃>10℃, 由此可见旋链角毛藻较适宜的增殖温度约为 20℃. 但是, 旋链角毛藻生长终止生物量与温度之间并不是严格的存在上述排序, 其原因主要是硝酸盐的同化只是影响藻生长的众多因素之

一, 而其他营养因素如藻细胞对磷和微量元素等吸收和利用的差异也都可能导致藻细胞的生长差异<sup>[28-30]</sup>. 综合来看, NRA 的变化能够较真实地反应旋链角毛藻的生长状态.

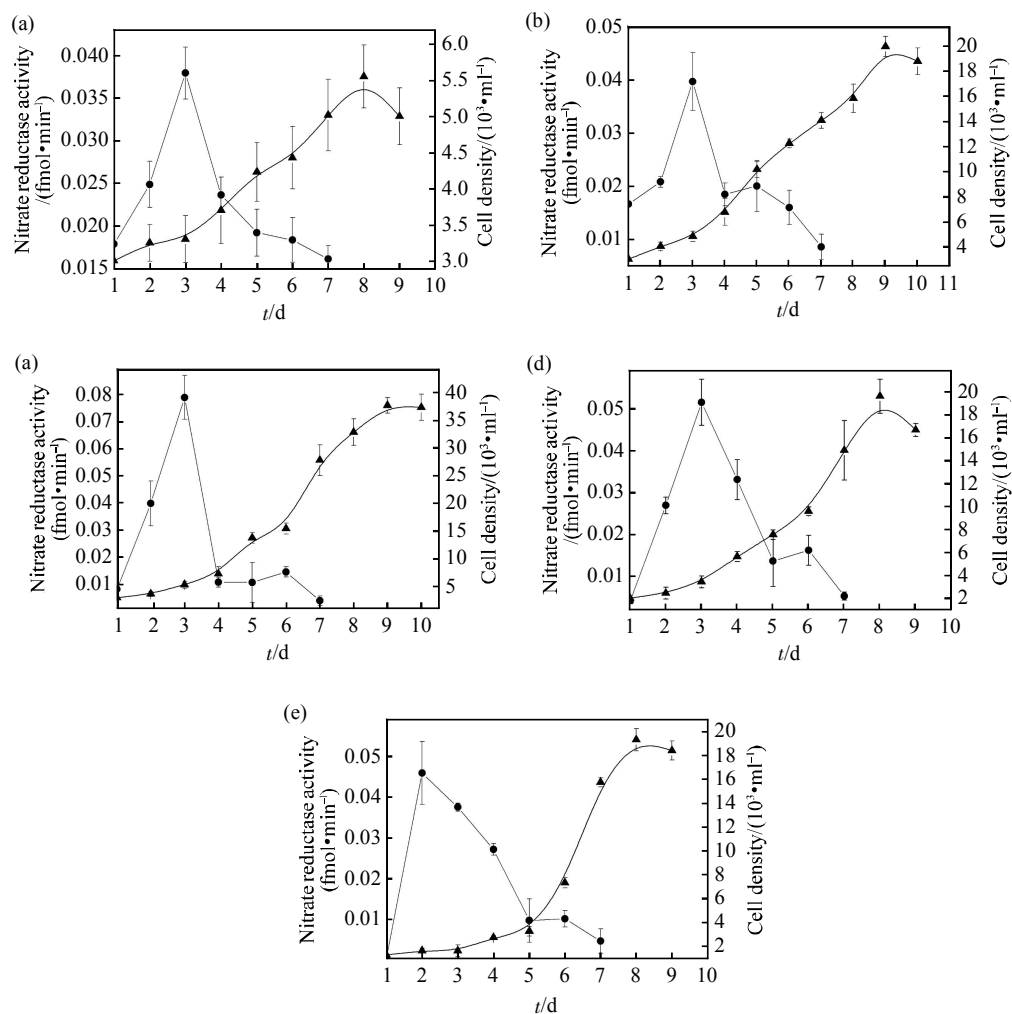


Fig. 1 Plots of the growth of *C. curvisetus* and NRA variety at different temperatures

(a), (b), (c), (d), (e) corresponding to 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃. ●—●: Nitrate reductase activity; ▲—▲: Cell density.

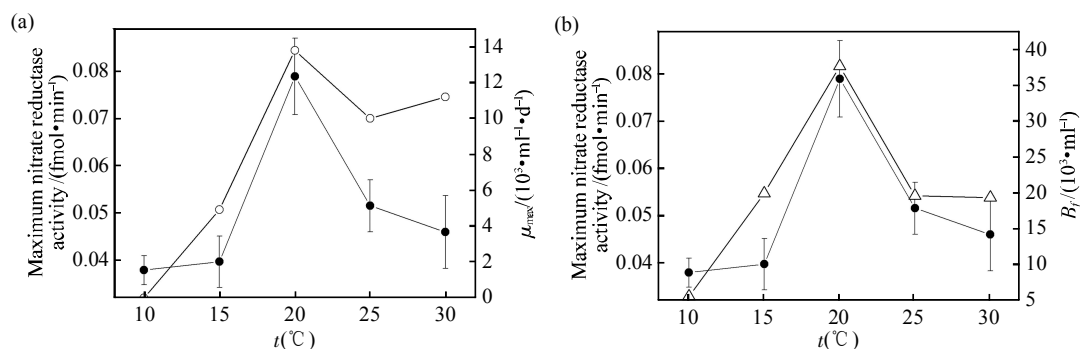


Fig. 2 Varieties of  $NRA_{max}$ ,  $\mu_{max}$  and  $B_f$  of *C. curvisetus* at different temperatures

(a) ●—●: Maximum nitrate reductase activity; ○—○:  $\mu_{max}$ ; (b) ●—●: Maximum nitrate reductase activity; △—△:  $B_f$ .

## 2.2 温度对米氏凯伦藻生长及 NRA 的影响

初始营养盐浓度(硝酸盐  $32 \mu\text{mol/L}$ 、磷  $1.5 \mu\text{mol/L}$ )相同, 不同温度条件下米氏凯伦藻细胞生长情况和细胞硝酸还原酶活力与培养时间的变化曲线如图 3 所示. 当培养温度为  $10^\circ\text{C}$  和  $30^\circ\text{C}$  时, 该藻几乎无法正常生长, NRA 的变化也无一定规律. 培养温

度为  $15^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$  和  $25^\circ\text{C}$  时, 米氏凯伦藻藻细胞密度随培养时间以及 NRA 随培养时间的变化曲线具有相似性, 即米氏凯伦藻自接种后, 经过短暂的延滞期迅速进入指数生长期, 其生长曲线符合 S-logistic2 模型; 随着培养的进行, 藻 NRA 同样表现出先增大后降低的趋势.

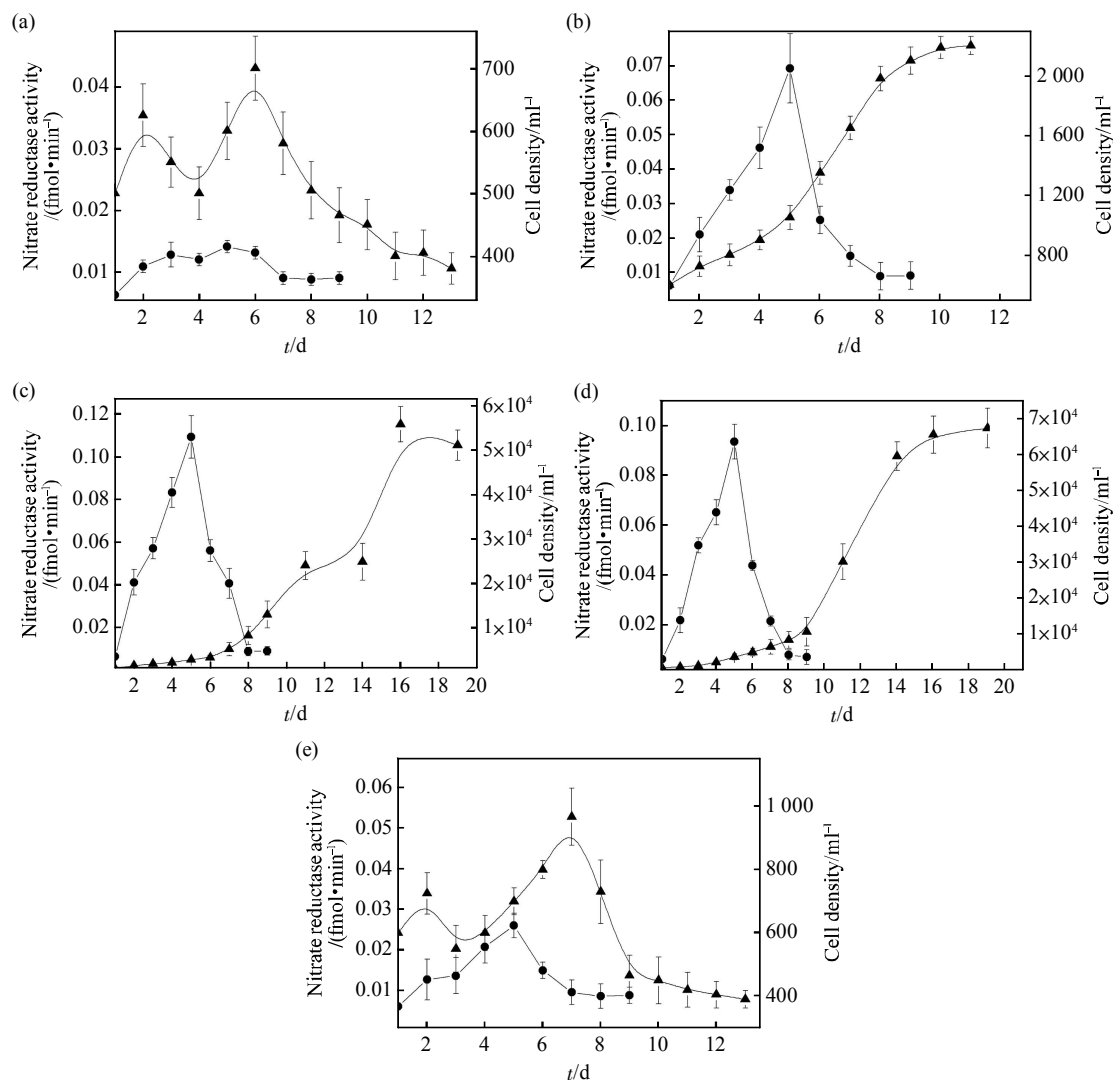


Fig. 3 Plots of the growth of *K. mikimotoi* and NRA variety at different temperatures

(a), (b), (c), (d), (e) corresponding to  $10^\circ\text{C}$ ,  $15^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ . ●—●: Nitrate reductase activity; ▲—▲: Cell density.

具体来讲, 在  $10^\circ\text{C}$  和  $30^\circ\text{C}$  条件下, 该藻几乎无法正常生长, 生长曲线呈现不规则的波动性, 其 NRA 一直处于较低水平且变化不大, NRA 平均值分别为  $(0.011 \pm 0.003)$  和  $(0.014 \pm 0.006) \text{fmol} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 当培养温度分别为  $15^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$  和  $25^\circ\text{C}$  时米氏凯伦藻的生长情况及 NRA 变化基本一致:  $15^\circ\text{C}$  条件下, 自接种后米氏凯伦藻初期生长缓慢, 硝酸还原酶活力

逐渐增强, 至第 5 天达到最大值, 其  $\text{NRA}_{\text{max}}$  为  $(0.069 \pm 0.008) \text{fmol} \cdot \text{min}^{-1}$ , 随培养的进行, 藻细胞数量开始迅速增多, 硝酸还原酶活力达到最大值, 随后急剧下降; 同时随着培养液中营养盐的大量消耗, 该藻在培养的第 11d 到达平台期, 最大藻密度  $2.2 \times 10^3/\text{ml}$ , 约为接种初期的 3.6 倍; 当温度为  $20^\circ\text{C}$  时, 米氏凯伦藻生长要显著优于  $15^\circ\text{C}$ , 且藻

细胞的生长延滞期更长, 至接种后的第 8 天才进入指数生长期; 但培养后的第 5 天就出现了  $\text{NRA}_{\max}$  ( $(0.11 \pm 0.01) \text{fmol} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 且明显高于  $15^\circ\text{C}$  下的  $\text{NRA}_{\max}$ , 该温度条件下藻的生长曲线基本符合 S 型, 先后经历了生长迟滞期、快速生长期以及生长的平台期, 最大藻密度出现在接种后的第 16 天 ( $5.6 \times 10^4/\text{ml}$ ), 约为接种时藻密度的 62 倍;  $25^\circ\text{C}$  时的米氏凯伦藻生长曲线也呈较明显的 S 形, 在接种后的第 16 天进入平台期, 其最大藻细胞密度为  $6.7 \times 10^4/\text{ml}$ , 明显晚于  $\text{NRA}_{\max}$  出现的第 5 天. 此外, 对于所有的实验组而言, 接种 10d 后, 该藻的  $\text{NRA}$  基本处于恒定低值.

图 4 是米氏凯伦藻的最大生长速率  $\mu_{\max}$ 、最大硝酸还原酶活力  $\text{NRA}_{\max}$  以及终止生物量  $B_f$  随温度的变化曲线. 进一步分析可知, 米氏凯伦藻在  $15^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$  范围内可以生长. 在实验设计的条件下,  $25^\circ\text{C}$  是米氏凯伦藻生长的一个拐点, 偏离该温度,  $\mu_{\max}$  及  $B_f$  都有一定程度的降低;  $25^\circ\text{C}$  的  $\text{NRA}_{\max}$  与  $20^\circ\text{C}$  的差异不大, 说明  $20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$  范围可能是米氏凯伦藻的适宜生长温度, 在此温度范围内藻体酶活力较高, 藻体生长状况的指示参数  $\mu_{\max}$  及  $B_f$  也较大. 由此可知米氏凯伦藻适宜增殖温度约为  $20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ , 与龙华等<sup>[31]</sup>报道的  $20.5^\circ\text{C} \sim 24.0^\circ\text{C}$  的温度范围一致.

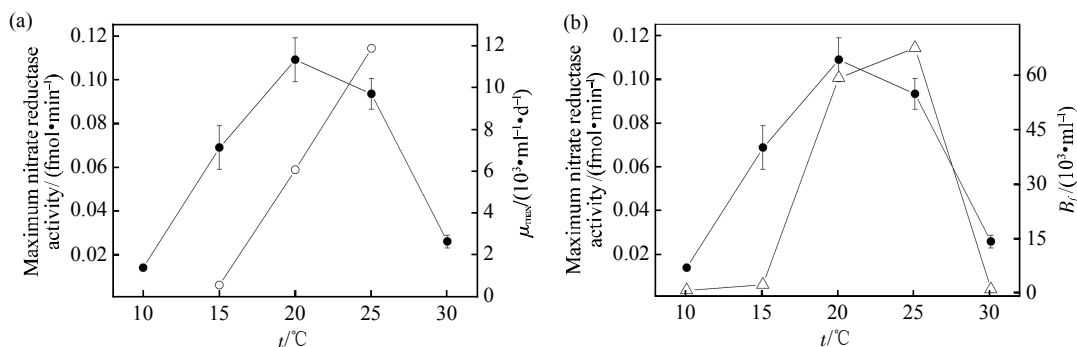


Fig. 4 Varieties of  $\text{NRA}_{\max}$ ,  $\mu_{\max}$  and  $B_f$  of *K. mikimotoi* at different temperatures

(a) ●—●: Maximum nitrate reductase activity; ○—○:  $\mu_{\max}$ ; (b) ●—●: Maximum nitrate reductase activity; △—△:  $B_f$ .

综上所述, 在旋链角毛藻及米氏凯伦藻能正常生长的温度范围内, 各藻  $\text{NRA}_{\max}$  均早于该培养组最大藻密度数天前出现, 提示藻的  $\text{NRA}_{\max}$  可以指示微藻生物量的变化情况. 同时,  $\text{NRA}_{\max}$  随温度的变化趋势也基本与藻的生长指示参数  $\mu_{\max}$  和  $B_f$  的变化相同(类似), 这表明, 虽然藻的  $\text{NRA}$  只是反映了藻同化硝酸盐能力的大小, 但在以  $\text{NO}_3\text{-N}$  为主要氮源的情况下,  $\text{NRA}$  的大小可以在一定程度上反映出藻的生长状况. 此外, 对比旋链角毛藻与米氏凯伦藻正常生长的温度范围及生长参数随温度变化的幅度, 可以看出, 米氏凯伦藻的适宜生长温度范围( $20 \sim 25^\circ\text{C}$ )较旋链角毛藻( $15 \sim 30^\circ\text{C}$ )窄, 且其最适生长温度提示该藻更偏好高温.

### 2.3 温度对旋链角毛藻和米氏凯伦藻生长及硝酸还原酶活力影响的对比

以往的研究结果表明, 温度会明显影响海洋微藻的生长, 这与本文对旋链角毛藻及米氏凯伦藻的

研究结果相一致<sup>[18-19]</sup>. 由于硝酸还原酶为细胞内的诱导酶, 当其诱导生成时, 存在于微藻藻细胞之内, 这样, 当采用单个细胞的  $\text{NRA}$  来进行不同藻种之间硝酸盐同化能力的比较时, 将由于各藻藻细胞体积的不同而导致比较结果存在一定的偏差. 为此, 将上述两种藻的  $\text{NRA}_{\max}$  进行体积归一化, 即在进行种间比较时需以单位体积内硝酸还原酶活力的大小为参数, 以期降低藻细胞体积不同而带来的影响. 在进行体积归一化的过程中, 米氏凯伦藻细胞体积大小参考赵晓玮<sup>[32]</sup>的研究结果确定为  $730.05 \mu\text{m}^3$ , 旋链角毛藻则根据王修林等<sup>[24]</sup>提供的中值等效球径进行估算得其细胞体积为  $264.16 \mu\text{m}^3$ . 据此可获得上述两种研究微藻单位体积的最大硝酸还原酶活力( $(\text{NRA}_{\max})_v$ )(表 1). 由表 1 可以看出, 在两种藻均能正常生长的温度范围内, 两种藻的  $(\text{NRA}_{\max})_v$  大小顺序为: 旋链角毛藻 > 米氏凯伦藻, 且两者的  $\mu_{\max}$  也基本符合旋链角毛藻 > 米氏凯伦

藻. 由此推测, 在硝酸盐、光照等条件不受限制的情况下, 相对于米氏凯伦藻而言, 旋链角毛藻能更好地利用硝酸盐, 来促使细胞的生长繁殖.

Table 1 Data of  $\mu_{\max}$  and  $\text{NRA}_{\max}$  in units of *C. curvisetus* and *K. mikimotoi* at different temperatures

| Temperature/°C | $(\text{NRA}_{\max})_v / (\mu\text{m}^3 \cdot \text{fmol} \cdot \text{min}^{-1})$ |                       | $\mu_{\max} / (\text{ml}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})$ |                     |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------|---------------------|
|                | <i>C. curvisetus</i>                                                              | <i>K. mikimotoi</i>   | <i>C. curvisetus</i>                                | <i>K. mikimotoi</i> |
| 15             | $1.50 \times 10^{-4}$                                                             | $9.45 \times 10^{-5}$ | $4.92 \times 10^3$                                  | $5.38 \times 10^2$  |
| 20             | $2.98 \times 10^{-4}$                                                             | $1.49 \times 10^{-4}$ | $1.38 \times 10^4$                                  | $6.06 \times 10^3$  |
| 25             | $1.95 \times 10^{-4}$                                                             | $1.28 \times 10^{-4}$ | $1.00 \times 10^4$                                  | $1.19 \times 10^4$  |

3 结 论

a. 旋链角毛藻在设定的 5 个温度下均可正常生长, 藻种在接种后先经历短暂生长迟滞期, 随后进入指数生长期. 而米氏凯伦藻在 10℃ 和 30℃ 下几乎无法生长, 但在 15℃、20℃ 和 25℃ 温度条件下生长情况与旋链角毛藻相似.

b. 旋链角毛藻和米氏凯伦藻  $\text{NRA}$  随培养时间的变化趋势均呈现慢升快降的不对称倒“V”形曲线, 藻细胞  $\text{NRA}_{\max}$  均出现在近指数生长期的时刻, 并早于最大藻密度出现. 两种实验藻种在各培养条件下的  $B_f$ 、 $\mu_{\max}$  及  $\text{NRA}_{\max}$  随温度的变化趋势基本一致. 说明硝酸还原酶活力的高低可以在一定程度上体现实验藻种的生长情况.

c. 旋链角毛藻和米氏凯伦藻生长的最适温度存在种间差异. 但在一定的温度范围内, 两种实验藻种的  $\mu_{\max}$ 、 $\text{NRA}_{\max}$ 、 $B_f$  均随着温度的升高呈现出先增大后降低的趋势, 基本符合 Shelford 耐受定律. 与旋链角毛藻相比, 米氏凯伦藻适宜生长温度范围较窄且更偏向高温. 在相同的光照和初始营养盐浓度条件下, 同一温度培养条件下单位体积  $\text{NRA}_{\max}$  大小关系基本符合旋链角毛藻 > 米氏凯伦藻, 且两种藻种之间的  $\mu_{\max}$  也基本符合旋链角毛藻 > 米氏凯伦藻, 这表明, 温度影响着实验各藻种同化硝酸盐的能力, 进而影响藻的生长; 两者相比较, 旋链角毛藻能很好地利用环境中的硝酸盐, 促使自身的生长繁殖.

参 考 文 献

[1] 王 奎, 陈建芳, 金海燕, 等. 长江口及邻近海区营养盐结构与限制. 海洋学报, 2013, **35**(3): 128-136  
Wang K, Chen J F, Jin Hai-yan, et al. Acta Oceanologica Sinica(in Chinese), 2013, **35**(3): 128-136

[2] Lei Q Y, Lv S H. Molecular ecological responses of dinoflagellate, *Karenia mikimotoi* to environmental nitrate stress. Mar Pollut Bull, 2011, **62**(12): 2692-2699

[3] Liu L S, Zhou J, Zheng B H, et al. Temporal and spatial distribution of red tide outbreaks in the Yangtze River Estuary and adjacent waters, China. Mar Pollut Bull, 2013, **72**(1): 213-221

[4] Lou X L, Hu C M. Diurnal changes of a harmful algal bloom in the East China Sea: observations from GOCI. Remote Sens Environ, 2014, **140**(0): 562-572

[5] Imai I, Yamaguchi M. Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella*. Harmful Algae, 2012, **14**(0): 46-70

[6] 陈艳拢, 赵冬至, 杨建洪, 等. 赤潮藻类温度生态幅的定量表达模型研究. 海洋学报, 2009, **31**(5): 156-161  
Chen Y L, Zhao D Z, Yang J H, et al. Acta Oceanologica Sinica, 2009, **31**(5): 156-161

[7] Yamaguchi H, Mizushima K, Setsuko S, et al. Effects of temperature, salinity and irradiance on growth of the novel red tide flagellate *Chattonella ovata* (Raphidophyceae). Harmful Algae, 2012, **9**(4): 398-401

[8] Wu L F, Chen P C, Lee C M. The effects of nitrogen sources and temperature on cell growth and lipid accumulation of microalgae. Int Biodeter Biodegr, 2013, **85**(0): 506-510

[9] Li J, Glibert P M, Zhou M J. Temporal and spatial variability in nitrogen uptake kinetics during harmful dinoflagellate blooms in the East China Sea. Harmful Algae, 2010, **9**(6): 531-539

[10] Kyaing M S, 顾立江, 程红梅. 植物中硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的作用. 生物技术进展, 2011, **1**(3): 159-164  
Kyaing M S, GU L J, Cheng H M. Current Biotechnology, 2011, **1**(3): 159-164

[11] Bianucci E, Fullana C, Furlan A, et al. Antioxidant defense system responses and role of nitrate reductase in the redox balance maintenance in *Bradyrhizobium japonicum* strains exposed to cadmium. Enzyme Microb Technol, 2013, **53**(5): 345-350

[12] Coelho C, Jacopo M, David R, et al. Induced peroxidase activity of haem containing nitrate reductases revealed by protein film electrochemistry. J Elec Chem, 2013, **693**(0): 105-113

[13] 李大勇, 徐克章, 董雅致, 等. 氮水平对不同大豆品种生理特性及产量的影响. 大豆科学, 2013, **32**(3): 365-375

- Li D Y, Xu K Z, Dong Y Z, *et al.* Soybean Science, 2013, **32**(3): 365-375
- [14] 卢凤刚, 陈贵林. 氮素浓度及形态对韭菜硝酸盐及硝酸还原酶活性的影响. 北方园艺, 2011(04): 41-43  
Lu F G, Chen G L. Northern Horticulture, 2011(04): 41-43
- [15] Saker F S, Arslan H, Serap K, *et al.* Nitrate reductase activity (NRA) in *Asphodelus aestivus* Brot. (Liliaceae): distribution among organs, seasonal variation and differences among populations. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 2010, **205**(8): 527-531
- [16] Rosales E P, Lannone M F, Groppa M D, *et al.* Nitric oxide inhibits nitrate reductase activity in wheat leaves. Plant Physiol Biochem, 2011, **49**(2): 124-130
- [17] Rachutin Zalagin T, Pick U. Inhibition of nitrate reductase by azide in microalgae results in triglycerides accumulation. Algal Research, 2014(3): 17-23
- [18] 何 玲, 张祖德. 不同条件下辣椒发酵过程硝酸还原酶活性和亚硝酸盐含量变化. 中国酿造, 2012, **31**(1): 125-129  
He L, Zhang Z D. China Brewing, 2012, **31**(1): 125-129
- [19] Hajaya Malek G, Tezel U, Pavlostathis Spyros G. Effect of temperature and benzalkonium chloride on nitrate reduction. Bioresource Technology, 2011, **102**(8): 5039-5047
- [20] Calatayud Á, Gorbe E, Roca D, *et al.* Effect of two nutrient solution temperatures on nitrate uptake, nitrate reductase activity,  $\text{NH}_4^+$  concentration and chlorophyll a fluorescence in rose plants. Environ Exper Botany, 2008, **64**(1): 65-74
- [21] 董 昆, 郭守华. 苹果叶片硝酸还原酶活性影响因素的研究. 河北果树, 2010(4): 4-8  
Dong K, Guo S H. Hebei Frutis, 2010(4): 4-8
- [22] Berges J A, Harrison P J. 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. Limnol Oceanogr, 1995, **40**(1): 82-93
- [23] 唐洪杰, 王修林, 祝陈坚, 等. 两种海洋微藻硝酸还原酶活性测定方法的比较研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2006, **36**(6): 981-986  
Tang H J, Wang X L, Zhu C J, *et al.* Period Ocean Univ Chin, 2006, **36**(6): 981-986
- [24] 王修林, 邓宁宁, 祝陈坚, 等. 磷酸盐、硝酸盐组成对海洋赤潮藻生长的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2004, **34**(3): 453-460  
Wang X L, Deng N N, Zhu C J, *et al.* Period Ocean Univ Chin, 2004, **34**(3): 453-460
- [25] 茅 华, 许 海, 刘兆普. 温度、光照、盐度及 pH 对旋链角毛藻生长的影响. 生态科学, 2007, **26**(5): 432-436  
Mao H, Xu H, Liu Z P. Ecological Science, 2007, **26**(5): 432-436
- [26] Song B, Ward B B. Molecular characterization of the assimilatory nitrate reductase gene and its expression in the marine green alga *dunaliella tertiolecta* (chlorophyceae). J Phycol, 2004, **40**(4): 721-731
- [27] 吕嘉扬, 王大志, 洪华生, 等. 两种硝酸盐浓度下威氏海链藻和盐生杜氏藻硝酸还原酶活力研究. 集美大学学报, 2004, **9**(1): 6-10  
Lu J Y, Wang D Z, Hong H S, *et al.* J Jimei Univ (Nat Sci), 2004, **9**(1): 6-10
- [28] 王金花. 氮磷营养盐对东海典型浮游植物生长及硝酸还原酶活性的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008  
Wang J H. Effects of Nitrate and Phosphate on the Growth and Nitrate Reductase Activity of typical phytoplankton in East China Sea. Qingdao: Ocean University of China, 2008
- [29] Van Moorleghe C, De Schutter N, Smolders E, *et al.* Bioavailability of organic phosphorus to *Pseudokirchneriella subcapitata* as affected by phosphorus starvation: an isotope dilution study. Water Research, 2013, **47**(9): 3047-3056
- [30] Cheirsilp B, Torpee S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. Bioresource Technology, 2012, **110**(0): 510-516
- [31] 龙 华, 杜 琦. 福建沿海米氏凯伦藻赤潮的初步研究. 福建水产, 2005, **12**(4): 22-26  
Long H, Du Q. Mar Environ Sci, 2005, **12**(4): 22-26
- [32] 赵晓玮. 环境中不同氮磷营养盐浓度及氮源形态对米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*) 生长的影响研究. 青岛: 中国海洋大学, 2010  
Zhao X W. Effects of the Various Ambient Nitrogen, Phosphorus Concentrations and Nitrogen Sources on Growth of *Karenia mikimotoi* Under Laboratory Conditions. Qingdao: Ocean University of China, 2010

## Effects of Temperature on The Growth and Nitrate Reductase Activity of *Chaetoceros curvisetus* and *Karenia mikimotoi*

DAI Ai-Quan<sup>1,2)</sup>, SHI Xiao-Yong<sup>3, 1, 2)</sup>, DING Yan-Yan<sup>1, 2)</sup>, TANG Hong-Jie<sup>1, 2)</sup>\*,  
WANG Li-Sha<sup>1, 2)</sup>, WANG Xiu-Lin<sup>1, 2)</sup>

<sup>(1)</sup> College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China;

<sup>(2)</sup> Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China;

<sup>(3)</sup> National Marine Hazard Mitigation Service, Beijing 100194, China)

**Abstract** Two dominant microalgae species in the East China Sea (ESC), *Chaetoceros curvisetus* (*C. curvisetus*) and *Karenia mikimotoi* (*K. mikimotoi*), were chosen to study the effects of temperature on microalga growth, nitrate reductase activity (NRA), and their relationship under laboratory set-up. At the beginning of the incubation, DIN, PO<sub>4</sub>-P, and SiO<sub>3</sub>-Si were added to 4 500 ml sea water in 5 L bottles to form a final concentration of 32 μmol/L, 1.5 μmol/L and 32 μmol/L, respectively. The bottles were then incubated under ambient sunlight (about 50 W·m<sup>-2</sup>) at different temperatures (10°C, 15°C, 20°C, 25°C, and 30°C) for 10~20 days. Triplicates were employed for all treatments. The microalgae cell numbers were counted by hemacytometer counting method. S-logistic 2 population growth model was used to simulate microalgae growth, and calculate two growth-related parameters, the maximum growth rate ( $\mu_{\max}$ ) and the final biomass ( $B_f$ ). The activity of nitrate reductase was measured *in vitro* and its relations to microalgal growth were elucidated. The two microalgae were observed to adapt to different temperature ranges. *C. curvisetus* could grow normally in the range of 10°C ~ 30°C, while *K. mikimotoi* only grew well between 15°C ~ 25°C. Both  $\mu_{\max}$  and  $B_f$  reached the peak values at 20°C for *C. curvisetus* and at 25°C for *K. mikimotoi*, respectively. These results indicated that compared to *C. curvisetus*, *K. mikimotoi* had a relatively narrow range of suitable temperature and a high optimum temperature ( $T_{\text{opt}}$ ). Throughout the incubation time, NRA of the two species changed similarly under different temperatures. NRA raised slowly at the first 3~5 days, and then dropped rapidly. The maximum NRA values ( $\text{NRA}_{\max}$ ) usually occurred at the early exponential growth phase, prior to appearing time of  $\mu_{\max}$  and  $B_f$ . The relations of  $\mu_{\max}$ ,  $\text{NRA}_{\max}$  and  $B_f$  with temperature followed the Shelford tolerance law. All above results suggested that temperature could affect the nitrate assimilation ability of microalgae, and subsequently affect the growth of algae.  $\mu_{\max}$  and the  $\text{NRA}_{\max}$  per unit volume of the *C. curvisetus* were higher than those of *K. mikimotoi* under the same environmental conditions, indicating that *C. curvisetus* might have a better ability of absorbing and utilizing nitrate for self-growth than *K. mikimotoi*.

**Key words** *Chaetoceros curvisetus*, *Karenia mikimotoi*, nitrate reductase activity, temperature, maximum growth rate

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00465

\*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2010CB428701).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-532-66786617, E-mail: thjie@ouc.edu.cn

Received: February 25, 2014 Accepted: April 10, 2014