

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20231009001

http://www.yykxjz.cn/

李凌霄, 孙婧, 宋若晗, 崔正国, 曲克明, 王庆奎, 周明莹, 崔鸿武, 胡清静. 不同氮营养盐对赫氏颗石藻和三角褐指藻中DMSP含量的影响. 渔业科学进展, 2024, 45(2): 96-104

LI L X, SUN J, SONG R H, CUI Z G, QU K M, WANG Q K, ZHOU M Y, CUI H W, HU Q J. Effect of different nitrogen nutrients on DMSP content in *Emiliania huxleyi* and *Phaeodactylum tricornutum*. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(2): 96-104

## 不同氮营养盐对赫氏颗石藻和三角褐指藻中DMSP含量的影响\*

李凌霄<sup>1,2</sup> 孙婧<sup>3</sup> 宋若晗<sup>1,2</sup> 崔正国<sup>2</sup> 曲克明<sup>2</sup>  
王庆奎<sup>1①</sup> 周明莹<sup>2</sup> 崔鸿武<sup>2</sup> 胡清静<sup>2①</sup>

(1. 天津农学院水产学院 天津 300392; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 农业农村部海洋渔业与可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071; 3. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 山东 烟台 264006)

**摘要** 二甲基巯基丙酸内盐(dimethylsulfoniopropionate, DMSP)是地球上重要的有机硫化合物之一, 在全球硫循环和气候调节等方面发挥着重要作用。浮游植物是海洋环境中DMSP的主要生产者, 而氮营养盐是影响浮游植物产生DMSP的重要因素之一。本研究以赫氏颗石藻(*Emiliania huxleyi*) (DMSP高产量藻)与三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*) (DMSP中等产量藻)为对象, 通过室内培养实验, 对比分析了在不同氮营养盐浓度及不同氮营养盐类型条件下, 2种藻培养液中颗粒态DMSP (DMSPp)的含量及其与藻密度、单细胞DMSPp含量的关系。研究发现, 不同氮营养盐浓度或氮营养盐类型对赫氏颗石藻单细胞DMSPp含量影响较小( $P>0.05$ ), 培养液中的DMSPp浓度主要受藻细胞密度影响; 而不同氮营养盐浓度或氮营养盐类型对三角褐指藻单细胞的DMSPp含量影响显著( $P<0.05$ ), 培养液中的DMSPp浓度主要受藻的单细胞DMSPp含量影响。例如, 对于三角褐指藻来说, 低 $\text{NO}_3^-$ 浓度( $0\ \mu\text{mol/L}$ )培养组单细胞DMSPp平均含量是高 $\text{NO}_3^-$ 浓度( $1\ 764\ \mu\text{mol/L}$ )培养组的11倍; 在不同氮营养盐类型下,  $\text{NaNO}_3$ 培养组中总DMSPp的平均浓度分别为 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 培养组的3~4倍。推测以上差异可能与DMSP在不同藻类中的生理作用存在差异有关。

**关键词** 二甲基巯基丙酸内盐(DMSP); 赫氏颗石藻; 三角褐指藻; 氮营养盐

**中图分类号** P734 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)02-0096-09

二甲基巯基丙酸内盐(dimethylsulfoniopropionate, DMSP)是海洋浮游植物产生的一种含硫化合物(Kiene *et al*, 2000), 它构成了海洋藻类细胞内的硫储存库(Stefels *et al*, 2007; Galí *et al*, 2015), 是浮游植物重要的渗透保护剂、冷冻保护剂和抗氧化剂(Kirst

*et al*, 1991; Wittek *et al*, 2020; Sunda *et al*, 2002)。海洋浮游植物每年产生的DMSP高达 $10^9\ \text{t}$ , 这些DMSP被释放到环境中后, 在硫的生物地球化学循环及调节气候变化方面发挥着重要作用(Challenger *et al*, 1948; van Duyl *et al*, 1998; Stefels *et al*, 2007)。例如, DMSP

\* 国家自然科学基金青年基金(41606097)、山东省自然科学基金(ZR2022MD055)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022020006; 2020TD12)共同资助。李凌霄, E-mail: LLX7721@163.com

① 通信作者: 王庆奎, 教授, E-mail: wangqk@tjau.edu.cn; 胡清静, 副研究员, E-mail: huqj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2023-10-09, 收修改稿日期: 2023-10-30

被细菌降解为二甲基硫(dimethyl sulfide, DMS), DMS 通过海气交换被释放到大气中, 有助于形成云凝结核 (Lovelock *et al.*, 1972; Hatakeyama *et al.*, 1982), 增加对太阳光的反射率, 从而减轻温室效应。每年大约有 28.1 Tg 硫以 DMS 的形式进入大气, 约占全球总硫通量的 50% (Lana *et al.*, 2011; Watts, 1999)。

自经典的 CLAW 假说被报道以来(Charlson *et al.*, 1990), 在全球不同海域开展了大量关于 DMSP 的工作。近几十年来, 关于中国近海环境中 DMSP 的研究也开展了大量工作, 研究发现, 我国近海 DMSP 含量较高(Li *et al.*, 2023)。东海虽然仅占全球海洋面积的一小部分, 但其海洋表层 DMS 的释放量高达全球海洋贡献的 0.21% (Jian *et al.*, 2018)。其中, 长江冲淡水携带了大量  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NH}_4^+$ 和尿素等氮营养盐(Li *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2003), 它们可能是影响东海水体 DMSP 浓度的关键因素之一(Jian *et al.*, 2019; 孙策策等, 2023)。 $\text{NO}_3^-$ 等氮营养盐对水体中 DMSP 的影响是多方面的: 一方面, 氮营养盐促进浮游植物生长, 进而导致浮游植物丰度增加; 另一方面, DMSP 是含硫的化合物, 高浓度的  $\text{NO}_3^-$ 会抑制藻类单细胞中 DMSP 的含量。但不同藻类对氮营养盐的响应存在差异 (Song *et al.*, 2007; 乔玲等, 2022), 此外, 目前在不同类型氮营养盐对浮游植物 DMSP 含量的影响方面认识不充分。

本研究以 DMSP 生产能力不同的赫氏颗石藻 (*Emiliania huxleyi*) (DMSP 含量较高)和三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornerutum*) (DMSP 含量中等)为对象 (Keller *et al.*, 1989; Spielmeyer *et al.*, 2011), 在不同氮营养盐浓度和类型条件下进行室内培养实验。首先, 分析不同氮营养盐浓度条件下培养液中 DMSP 的含量变化特征及主要影响因素; 其次, 分析不同氮营养盐类型条件下培养液中 DMSP 含量的变化特征。本研究旨在为进一步认识不同氮营养盐浓度/类型对浮游植物合成 DMSP 的影响提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验藻种和培养条件

实验藻种赫氏颗石藻(有钙板)来源于厦门大学藻种库, 三角褐指藻来源于中国水产科学研究院黄海水产研究所细胞生物学实验室。实验用玻璃仪器均在 10% (V/V)盐酸中浸泡 24 h 后用超纯水洗净。

**1.1.1 不同氮营养盐浓度条件下赫氏颗石藻和三角褐指藻培养实验** 赫氏颗石藻正常生长条件下所需的  $\text{NO}_3^-$ 浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  (Sunda *et al.*, 2005)。在本

研究中, 以  $\text{NaNO}_3$  为氮源, 设置 5 种不同  $\text{NO}_3^-$ 浓度梯度, 分别为 0、10、25、100 (正常  $\text{NO}_3^-$ 浓度培养组)和 200  $\mu\text{mol/L}$  (高  $\text{NO}_3^-$ 浓度培养组)。三角褐指藻正常生长所需的  $\text{NO}_3^-$ 浓度为 882  $\mu\text{mol/L}$  (Guillard *et al.*, 1962)。在本研究中, 以  $\text{NaNO}_3$  为氮源, 设置 5 种不同  $\text{NO}_3^-$ 浓度梯度, 0、88、220、882 (正常  $\text{NO}_3^-$ 浓度培养组)和 1 764  $\mu\text{mol/L}$  (高  $\text{NO}_3^-$ 浓度培养组)。

**1.1.2 不同氮营养盐类型条件下赫氏颗石藻和三角褐指藻培养实验** 分别设置  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  (尿素)作为氮源供应, 赫氏颗石藻利用 Aquil 培养基浓度(100  $\mu\text{mol/L}$ )配制; 三角褐指藻利用 f/2 培养基浓度(882  $\mu\text{mol/L}$ )配制, 只改变其中氮源种类而不改变氮的浓度, 其他营养元素不变。

**1.1.3 培养方法** 每个培养组设 3 个平行, 藻种活化、扩培至对数生长期后接种于 1 L 锥形瓶中, 培养体积为 700 mL, 控制接种密度为  $6 \times 10^4$  cells/mL, 每天定时摇瓶 3 次。于恒温光照培养箱中进行培养, 光照强度为 4 500 lx, 温度为  $(20.0 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ , 光暗周期为 12 : 12 h。

### 1.2 藻细胞密度、比生长率的测定

培养过程中, 隔日取样, 用鲁哥试剂进行固定和染色, 用血球计数板在光学显微镜下计数, 每个样品计数 5 次, 去掉最大值与最小值后取平均值。计数后换算为藻细胞密度值, 藻细胞密度=血球计数板上藻细胞数目 $\times 10^4$  cells/mL。

藻细胞比生长率  $\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / (T_t - T_0)$ , 式中,  $N_t$  为藻类在  $T_t$  时刻的藻细胞密度,  $N_0$  为藻类接种时( $T_0$ )的藻细胞密度。

### 1.3 $\text{NO}_3^-$ 浓度的测定

在培养过程中, 隔日取 20 mL 藻液用于  $\text{NO}_3^-$ 浓度的检测, 每组样品测定 3 个平行, 采用营养盐自动分析仪(QuAAtro, 德国)测定。

### 1.4 DMSPp 含量的测定

DMSP 的保存与测定: 取一定体积的培养藻液, 在重力作用下通过 0.7  $\mu\text{m}$  的 GF/F 滤膜, 收集最初的 4 mL 滤液, 并加入 20  $\mu\text{L}$  的 50%浓硫酸固定, 用作溶解态 DMSP (DMSPd)样品分析; 另取 10 mL 的未过滤藻液, 直接加入 50  $\mu\text{L}$  的 50%浓硫酸固定, 用作总 DMSP (DMSPt)样品分析(Kiene *et al.*, 2006)。取 2 mL 保存的 DMSP 样品, 加入 NaOH ( $\text{pH} \geq 13$ )并置于黑暗处 24 h, 使 DMSP 完全转化为 DMS, 并按照 DMS 测定方法测出其浓度, 按 1 : 1 的比例换算得到

DMSPd 和 DMSPt 的量,二者之差即为颗粒态 DMSP (DMSPp)浓度(Yang *et al.*, 2012)。

藻类培养中 DMSP 样品在第 4、6、9、11、15 天采集,即在藻类生长周期中采集样品共 5 次,包括在指数生长期和稳定生长期各采集样品 2 次、在衰退期采集样品 1 次(Keller *et al.*, 1999)。本研究中的所有 DMSP 浓度均为 DMSPp 浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 NO<sub>3</sub> 浓度对赫氏颗石藻和三角褐指藻生长及 DMSPp 的影响

**2.1.1 不同 NO<sub>3</sub> 浓度对赫氏颗石藻生长及 DMSPp 生产的影响** Sunda 等(2005)研究发现,赫氏颗石藻正常生长所需的 NO<sub>3</sub> 浓度为 100 μmol/L。本研究中,NO<sub>3</sub> 浓度为 100 μmol/L 的培养组,藻类比生长率在前 3 d 迅速增加,并在第 3 天达到最大值,随后逐渐降低(图 1a)。高 NO<sub>3</sub> 浓度(200 μmol/L)培养组藻类的比生长率与 100 μmol/L 培养组基本相同( $P>0.05$ )。在低于 100 μmol/L 的 3 个培养组中(25、10 和 0 μmol/L),赫氏颗石藻的比生长率显著低于 100 μmol/L 的培养组,但随 NO<sub>3</sub> 浓度升高,赫氏颗石藻比生长率显著增加( $P<0.05$ )。

藻细胞密度在不同 NO<sub>3</sub> 浓度下的变化趋势与比

生长率类似,整体都表现出随 NO<sub>3</sub> 浓度增加而增加的趋势。在 NO<sub>3</sub> 浓度为 200 μmol/L 的培养组中,藻细胞密度出现的最大值为  $110.30 \times 10^4$  cells/mL,NO<sub>3</sub> 浓度为 0 μmol/L 的培养组,藻细胞密度的最大值仅为  $30.80 \times 10^4$  cells/mL,是前者的 27.9%。而高 NO<sub>3</sub> 浓度组(200 μmol/L)比正常 NO<sub>3</sub> 浓度组(100 μmol/L)的藻细胞密度略高,但并没有通过显著性检验( $P>0.05$ )(图 1b)。

对比各组培养液中 DMSPp 的浓度可以发现其整体与藻细胞密度的变化类似,出现先增加后降低的趋势。此外,随着不同培养组中 NO<sub>3</sub> 浓度增加,培养液中的 DMSPp 浓度增加(图 1c)。

在单细胞 DMSPp 含量的变化中,大多数培养组出现随培养时间增加而逐渐增加的趋势,这可能是由于随培养时间的增加,NO<sub>3</sub> 浓度逐渐减少(图 1e、2e)。并且在不同 NO<sub>3</sub> 浓度的培养条件下,随着 NO<sub>3</sub> 浓度升高,单细胞 DMSPp 含量降低。NO<sub>3</sub> 浓度为 200 μmol/L 条件下,藻类生长周期中单细胞 DMSPp 的平均含量为  $(6.89 \pm 2.78)$  fmol/cell,NO<sub>3</sub> 浓度为 0 μmol/L 条件下,单细胞 DMSPp 的平均含量为  $(20.98 \pm 3.97)$  fmol/cell,约是 200 μmol/L 培养组单细胞平均含量的 3 倍(图 1d)。

总体来看,赫氏颗石藻培养液中 DMSPp 的浓度与藻细胞密度变化趋势一致,而与单细胞 DMSPp 的含量变化趋势不同。

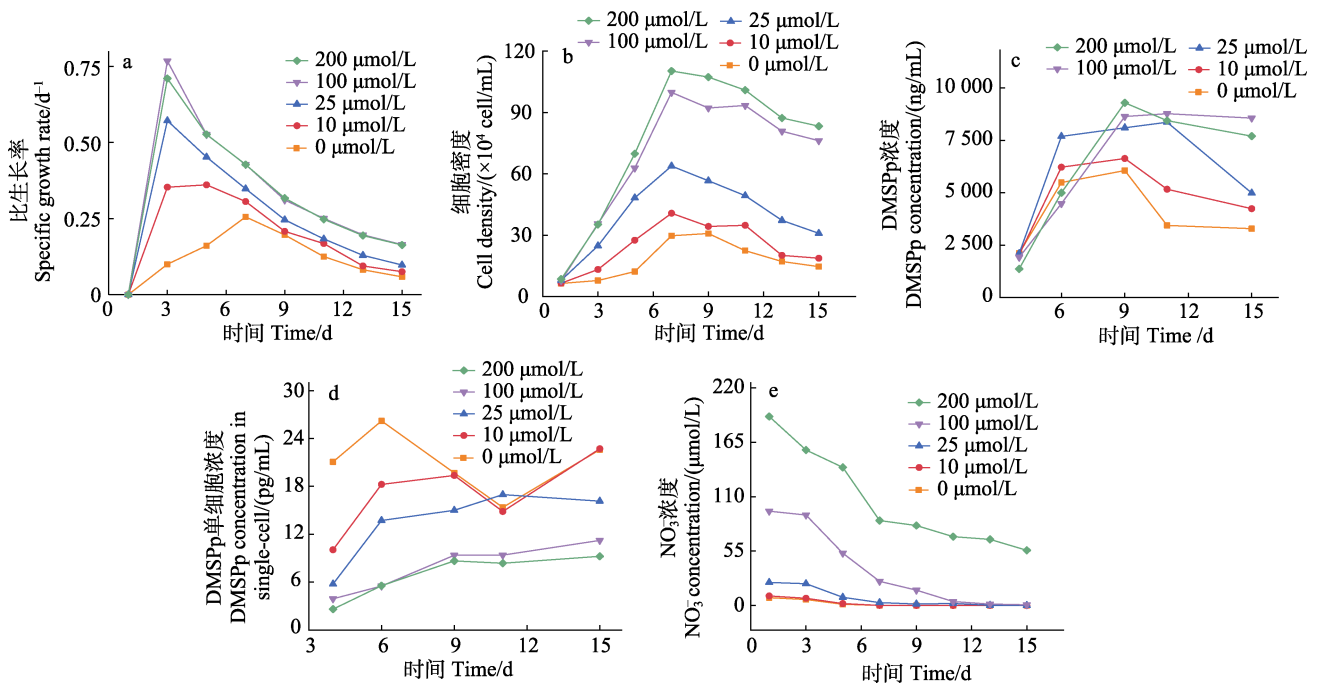


图 1 不同 NO<sub>3</sub> 浓度赫氏颗石藻的比生长率(a)、细胞密度(b)、培养液 DMSPp 浓度(c)、单细胞 DMSPp 浓度(d)和 NO<sub>3</sub> 浓度(e)  
Fig.1 Specific growth rate (a), cell density (b), DMSPp concentration in culture medium (c), DMSPp concentration in single-cell (d), and NO<sub>3</sub> concentration (e) of *E. huxleyi* under different NO<sub>3</sub> concentrations

**2.1.2 不同  $\text{NO}_3^-$  浓度对三角褐指藻生长及 DMSPp 生产的影响** Guillard 等(1962)研究发现, 三角褐指藻正常生长所需  $\text{NO}_3^-$  浓度为  $882 \mu\text{mol/L}$ 。本研究,  $882 \mu\text{mol/L}$  浓度组的比生长率也出现前 3 d 迅速增加、随后逐步降低的现象。高  $\text{NO}_3^-$  浓度组( $1764 \mu\text{mol/L}$ )比生长率与  $882 \mu\text{mol/L}$  培养组无显著差异。在低于  $882 \mu\text{mol/L}$  的 3 个培养组( $0$ 、 $88$  和  $220 \mu\text{mol/L}$ )中, 三角褐指藻的比生长率明显低于  $882 \mu\text{mol/L}$  培养组, 与赫氏颗石藻的结果相似, 随着  $\text{NO}_3^-$  浓度的增加三角褐指藻的比生长率显著增加( $P < 0.05$ )(图 2a)。

同时, 各培养组的藻细胞密度与比生长率类似, 随着  $\text{NO}_3^-$  浓度升高, 藻细胞密度增加。高  $\text{NO}_3^-$  浓度组( $1764 \mu\text{mol/L}$ )藻细胞密度最大值为  $220.2 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ , 而低  $\text{NO}_3^-$  浓度组( $0 \mu\text{mol/L}$ )藻细胞密度最大值为  $78.7 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ , 仅为高  $\text{NO}_3^-$  组的 35.7%, 这说明 2 种藻都表现出高  $\text{NO}_3^-$  浓度条件促进藻细胞生长的现象。与赫氏颗石藻结果相似, 高  $\text{NO}_3^-$  浓度培养组( $1764 \mu\text{mol/L}$ )和正常  $\text{NO}_3^-$  浓度培养组( $882 \mu\text{mol/L}$ )的藻细胞密度无显著性差异( $P > 0.05$ ) (图 2b)。

在不同  $\text{NO}_3^-$  浓度培养组中, 三角褐指藻单细胞 DMSPp 含量也有随着培养时间的增加而增加的趋势, 这与赫氏颗石藻的现象一致(图 2c), 均由  $\text{NO}_3^-$  浓度逐渐降低而导致。同时, 各培养组整体与赫氏颗

石藻类似, 高  $\text{NO}_3^-$  浓度对藻单细胞 DMSPp 含量有明显的抑制作用。在高  $\text{NO}_3^-$  浓度组( $1764 \mu\text{mol/L}$ ), 藻类生长周期中单细胞 DMSPp 平均含量为  $(0.35 \pm 0.33) \text{ fmol/cell}$ , 而在低  $\text{NO}_3^-$  浓度条件下( $0 \mu\text{mol/L}$ ), 单细胞 DMSPp 平均含量为  $(3.93 \pm 2.31) \text{ fmol/cell}$ , 为高  $\text{NO}_3^-$  浓度组的 11 倍, 这一比值明显高于赫氏颗石藻的比值(图 2d)。

与赫氏颗石藻不同的是, 三角褐指藻培养液中 DMSPp 的浓度与单细胞 DMSPp 的变化趋势基本一致, 说明三角褐指藻培养液中 DMSPp 的浓度主要受单细胞 DMSPp 含量控制, 而非藻细胞密度。

**2.1.3 不同  $\text{NO}_3^-$  浓度对赫氏颗石藻和三角褐指藻生产 DMSPp 的影响** 在本研究中, 赫氏颗石藻在低  $\text{NO}_3^-$  浓度组( $0 \mu\text{mol/L}$ )藻细胞密度的最大值仅为高  $\text{NO}_3^-$  浓度组的 27.9%; 三角褐指藻低  $\text{NO}_3^-$  浓度组中( $0 \mu\text{mol/L}$ )藻细胞密度的最大值仅为高  $\text{NO}_3^-$  浓度组的 35.7%。 $\text{NO}_3^-$  浓度对赫氏颗石藻和三角褐指藻的生长促进作用一致, 均具有高  $\text{NO}_3^-$  浓度下藻细胞比生长率高、藻细胞密度也高的特点。但 2 种藻的高  $\text{NO}_3^-$  浓度组( $200 \mu\text{mol/L}$ )和正常  $\text{NO}_3^-$  浓度组( $100 \mu\text{mol/L}$ )的藻细胞密度无显著性差异。这说明氮营养盐增加至完全满足藻类生长时, 其浓度不会再大幅度促进藻的生长。

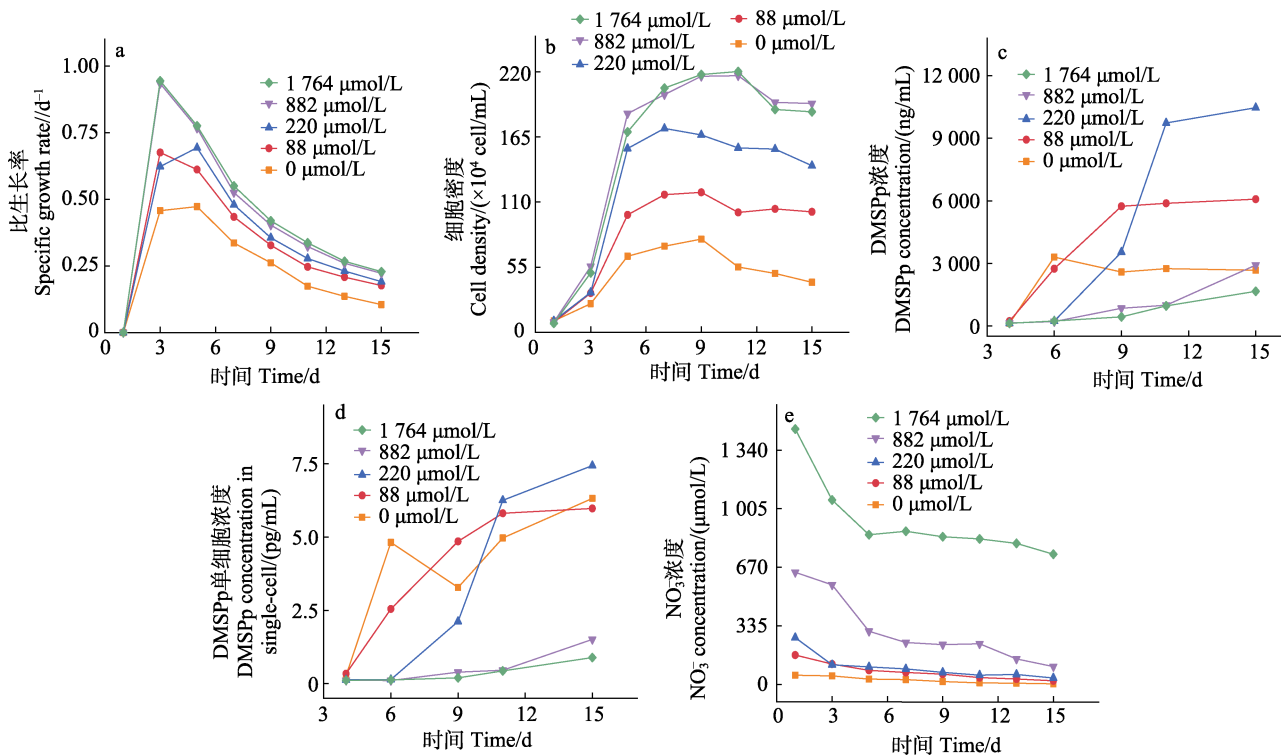


图 2 不同  $\text{NO}_3^-$  浓度三角褐指藻的比生长率(a)、细胞密度(b)、培养液 DMSPp 浓度(c)、单细胞 DMSPp 浓度(d)和  $\text{NO}_3^-$  浓度(e)  
Fig.2 Specific growth rate (a), cell density (b), DMSPp concentration in culture medium (c), DMSPp concentration in single-cell (d), and  $\text{NO}_3^-$  concentration (e) of *P. tricorutum* under different  $\text{NO}_3^-$  concentrations

在  $\text{NO}_3$  浓度差异对藻细胞合成 DMSPp 影响的实验中, 2 种藻的结果有一定差异。高  $\text{NO}_3$  浓度对藻细胞 DMSPp 的合成均有抑制作用, 对赫氏颗石藻来说, 低  $\text{NO}_3$  浓度组 ( $0 \mu\text{mol/L}$ ) 单细胞 DMSPp 平均含量为高  $\text{NO}_3$  浓度组 ( $200 \mu\text{mol/L}$ ) 的 3 倍; 而在三角褐指藻中, 低  $\text{NO}_3$  浓度组 ( $0 \mu\text{mol/L}$ ) 单细胞 DMSPp 平均含量为高  $\text{NO}_3$  浓度组 ( $1764 \mu\text{mol/L}$ ) 的 11 倍, 表明高  $\text{NO}_3$  浓度对三角褐指藻单细胞生产 DMSPp 的抑制作用更加显著。同时, 对比 2 种藻培养液中 DMSPp 浓度的变化趋势可以发现, 赫氏颗石藻培养液中的 DMSPp 浓度主要与藻细胞密度有关, 而三角褐指藻培养液中 DMSPp 浓度主要受单细胞 DMSPp 影响。这可能是由于  $\text{NO}_3$  对赫氏颗石藻单细胞 DMSPp 的影响相对较小, 所以培养液中的 DMSPp 主要受藻细胞密度的影响; 而在三角褐指藻中,  $\text{NO}_3$  对单细胞中 DMSPp 的含量抑制较明显, 相比藻细胞密度, 单细胞中 DMSPp 的含量对其影响更大。

McParland 等(2020)研究表明, 由于赫氏颗石藻是高 DMSP 的生产者, DMSP 在细胞内充当“相容性”溶质而存在, 氮的浓度对其藻细胞 DMSP 合成的影响较小。赫氏颗石藻细胞内 DMSP 的含量对氮营养盐限制的条件没有显著的反应(Keller *et al.*, 1999; McParland *et al.*, 2020; Sunda *et al.*, 2007)。而在 DMSP 的低生产者中, 其可能是作为藻细胞的抗氧化剂应对外界环境胁迫。Gröne 等(1992)研究认为, 在氮限制条件下, DMSP 类含硫渗透剂会取代含氮渗透剂(如甜菜碱)来维持细胞平衡。Sunda 等(2002)研究验证了 DMSP 及其降解产物在藻细胞中充当抗氧化剂, 藻细胞受到某些应激源(如较低的氮)引起的氧化刺激会增加。在以往报道中, 以大洋海链藻(*Thalassiosira oceanica*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)作为研究对象(Sunda *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 1999), 发现在氮不足条件下, 藻细胞内 DMSP 的产量出现大量增加。尽管目前对于三角褐指藻在低氮浓度下的响应机制报道较少, 但三角褐指藻与中肋骨条藻和微型海链藻都属于硅藻, 因此, 我们推测三角褐指藻对氮的响应也是由于 DMSP 充当藻细胞的抗氧化剂而导致。

## 2.2 不同氮营养盐类型对赫氏颗石藻和三角褐指藻生长及 DMSPp 生产的影响

### 2.2.1 不同氮营养盐类型对赫氏颗石藻生长及 DMSPp 生产的影响

在赫氏颗石藻各培养组中,  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  的浓度均为  $100 \mu\text{mol/L}$ , 是藻细胞正常生长所需浓度。培养的前 3 d, 各培养

组中赫氏颗石藻比生长率都表现出迅速增加的趋势, 并在第 3 天达到最大值, 随后逐渐减弱。 $\text{NaNO}_3$  和  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  培养组的比生长率变化曲线几乎完全一致,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培养组的比生长率略低(图 3a)。

3 个培养组的藻细胞密度也有随着培养时间先增加后降低的变化趋势。在  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  三个培养组中, 赫氏颗石藻的藻细胞密度最高值分别为  $104.75 \times 10^4$ 、 $94.75 \times 10^4$  和  $172.25 \times 10^4$  cells/mL。 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  作为氮源促进赫氏颗石藻生长最为明显, 其藻细胞密度是以  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源条件下藻细胞密度的 2 倍。

赫氏颗石藻的单细胞 DMSPp 含量在各培养组中存在一定差异, 整个培养过程中,  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  培养组赫氏颗石藻单细胞 DMSPp 平均产量分别为  $(8.68 \pm 0.74)$ 、 $(7.79 \pm 0.88)$  和  $(9.45 \pm 0.97)$  fmol/cell,  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  培养组略微高于其他 2 组, 但无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。对比 3 个培养组赫氏颗石藻培养液中 DMSPp 的浓度发现,  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  培养液中的 DMSPp 平均浓度分别是  $(7048.04 \pm 1753.80)$ 、 $(5898.16 \pm 1450.73)$  和  $(8689.36 \pm 2667.96)$  ng/mL,  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  培养液中的 DMSPp 浓度最高, 是  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培养液中的 DMSPp 平均浓度的 1.5 倍。

### 2.2.2 不同氮营养盐类型对三角褐指藻生长及 DMSPp 生产的影响

在三角褐指藻的  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  三个培养组中, 氮的浓度均为  $882 \mu\text{mol/L}$ , 是藻细胞正常生长所需浓度。实验前 3 d 各组比生长率迅速增加, 第 3 天达到最大值, 其中,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  两个培养组比生长率趋势相似,  $\text{NaNO}_3$  培养组在第 3~5 天比生长率比其他 2 组略高, 随后 3 个培养组趋向一致(图 4a)。

与赫氏颗石藻类似,  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  三种不同氮营养盐类型条件下, 三角褐指藻细胞密度整体呈先增加后逐渐降低的趋势, 藻细胞密度最大值分别为  $216.70 \times 10^4$ 、 $227.70 \times 10^4$  和  $242.20 \times 10^4$  cells/mL,  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  培养组略高, 但无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 与赫氏颗石藻 3 种氮营养盐类型条件下对藻细胞密度的促进结果相一致, 表明  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  作为氮源对 2 种藻的生长均最为有利(图 3b、4b)。

在单细胞 DMSPp 含量的变化中,  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培养组分别在第 9 天和第 11 天有显著升高, 第 15 天单细胞内 DMSPp 的含量是第 4 天的 2~8 倍。 $\text{NaNO}_3$  培养组单细胞 DMSPp 含量最高, 变化最为显著, 第 15 天单细胞内 DMSPp 的含量是第 4 天的 14 倍, 培养过程中的平均值是  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  培养组的 3~5 倍(图 4d)。

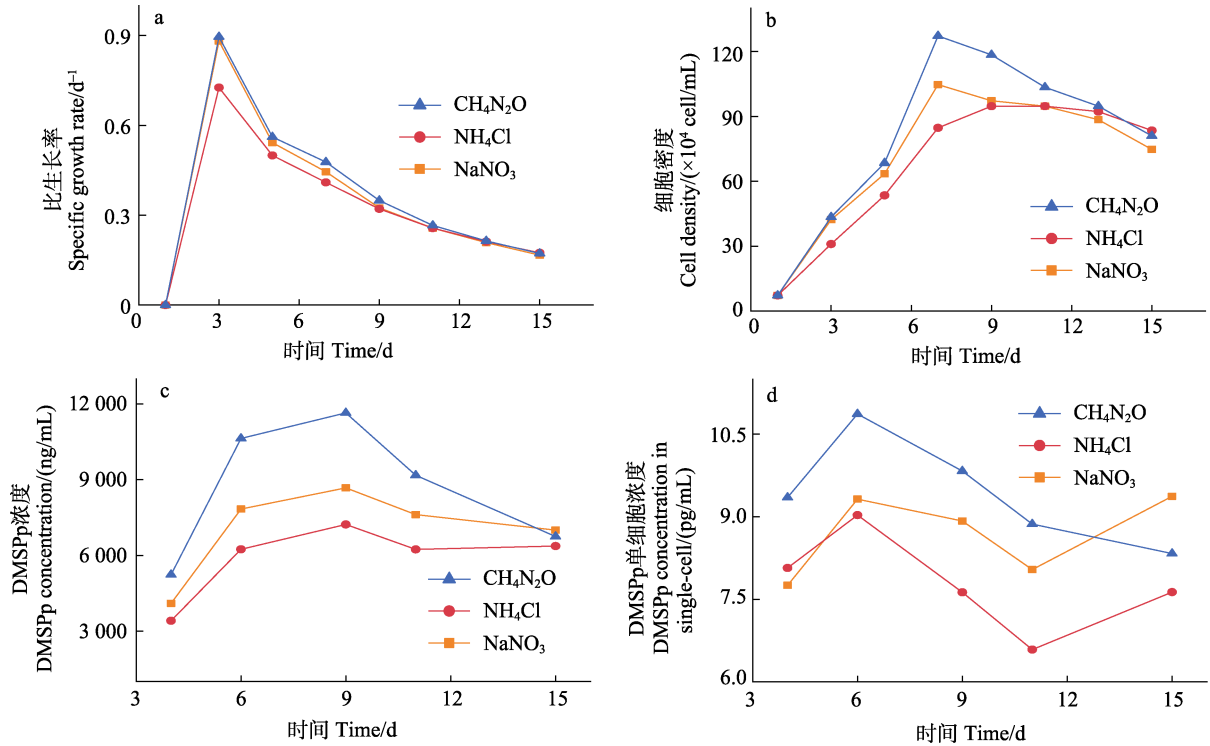


图 3 不同氮营养盐类型赫氏颗石藻的比生长率(a)、细胞密度(b)、培养液 DMSPp 浓度(c)和单细胞 DMSPp 浓度(d)  
Fig.3 Specific growth rate (a), cell density (b), DMSPp concentration in culture medium (c), and DMSPp concentration in single-cell (d) of *E. huxleyi* under different nitrogen nutrients

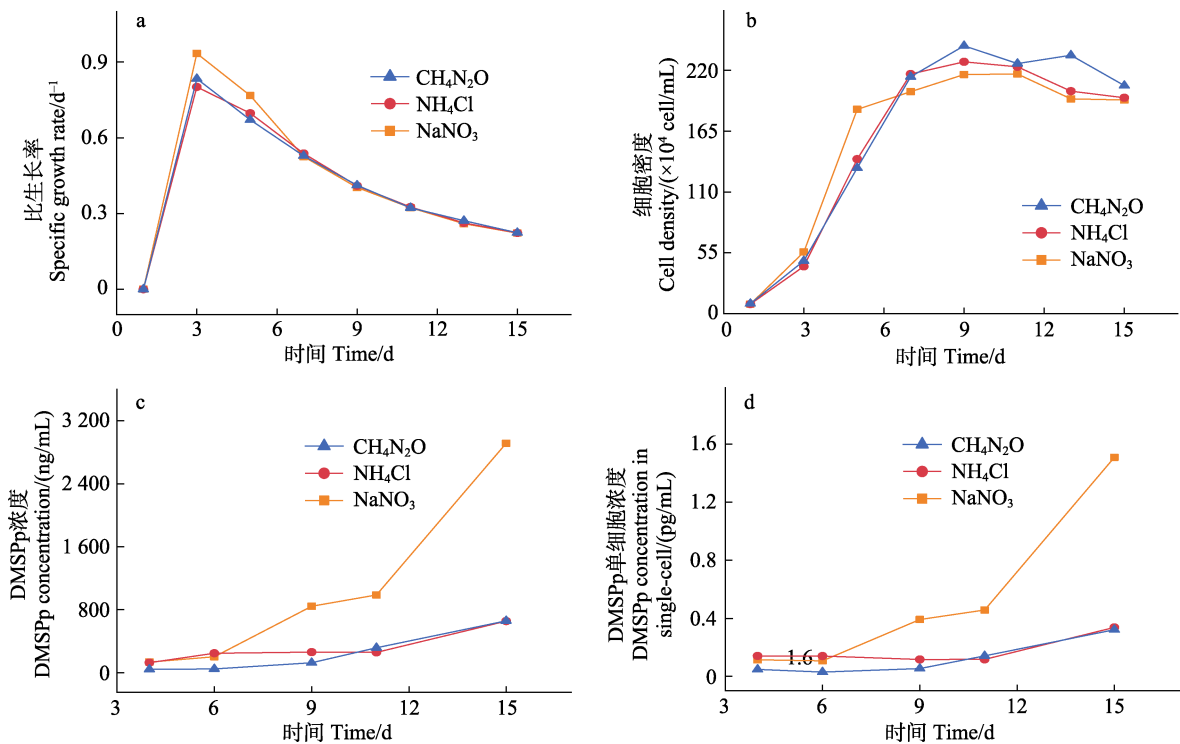


图 4 不同氮营养盐类型三角褐指藻的比生长率(a)、细胞密度(b)、培养液 DMSPp 浓度(c)和单细胞 DMSPp 浓度(d)  
Fig.4 Specific growth rate (a), cell density (b), DMSPp concentration in culture medium (c), and DMSPp concentration in single-cell (d) of *P. tricornutum* under different nitrogen nutrients

NaNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O 三组培养液中 DMSPp 浓度与单细胞 DMSPp 含量变化趋势基本一致,但培养液中 DMSPp 的平均浓度分别为(1 016.89±1 126.64)、(309.5±201.41)、(238.04±260.20) ng/mL,其中,在 NaNO<sub>3</sub> 作为氮源条件下,三角褐指藻细胞产生 DMSPp 的含量明显高于其他 2 个培养组,是 NH<sub>4</sub>Cl 和 CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O 条件下培养液中 DMSPp 浓度平均值的 3~4 倍(图 4c)。

**2.2.3 不同氮营养盐类型对赫氏颗石藻和三角褐指藻生产 DMSPp 的影响** 目前,国内外在不同氮营养盐类型对赫氏颗石藻和三角褐指藻生长影响已有比较充分的研究。Rees 等(2002)在北海北部赫氏颗石藻水华期间的现场观测发现,与 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>相比,尿素对藻生长的促进作用最强。张文源等(2016)以 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>和尿素为氮源培养三角褐指藻,发现在以尿素为氮源的培养条件下,三角褐指藻的生物量最高。在本研究中,与 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>相比,CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O 对 2 种藻的细胞密度也表现出更有利的促进作用(图 3a、4a)。

但目前人们对 3 种不同类型的氮营养盐对藻细胞生产 DMSP 的影响认识并不充分。培养液中 DMSPp 的浓度主要与藻细胞密度和单细胞 DMSPp 含量有关。赫氏颗石藻培养液中 DMSPp 浓度与藻细胞密度的变化趋势相似(图 3c),说明赫氏颗石藻培养液中 DMSPp 的浓度主要受藻细胞密度的影响;而三角褐指藻培养液中 DMSPp 浓度的变化与单细胞 DMSPp 含量趋势一致(图 4c、4d),NO<sub>3</sub><sup>-</sup>的影响较显著,NaNO<sub>3</sub> 培养液中 DMSPp 平均浓度分别为 NH<sub>4</sub>Cl 和 CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O 培养组的 3~4 倍,这进一步说明,对于高产种赫氏颗石藻,不同氮源对其细胞内 DMSP 的含量影响较小;对于 DMSP 生产处于中等水平的三角褐指藻,与尿素和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>相比,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>对藻细胞生产 DMSPp 的影响更加显著。

在本研究中,CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O 对赫氏颗石藻合成 DMSPp 的影响相对较强(图 3d),但与 NH<sub>4</sub>Cl 和 NaNO<sub>3</sub> 培养组无显著性差异( $P>0.05$ );而 NaNO<sub>3</sub> 对三角褐指藻合成 DMSPp 的作用明显大于 NH<sub>4</sub>Cl 和 CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O ( $P<0.05$ ) (图 4d),这可能是由于 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>对三角褐指藻细胞生产 DMSP 的影响更加敏感。

### 3 结论

本研究以赫氏颗石藻和三角褐指藻为对象,在不同氮营养盐浓度和不同氮营养盐类型的培养条件下,分析 2 种藻的藻细胞密度及 DMSP 含量的变化。结果发现,对赫氏颗石藻这类 DMSP 的高生产者来说,氮营养盐浓度及类型的改变对藻单细胞生产 DMSPp

的影响较小,2 个实验的各培养组之间无显著性差异( $P>0.05$ ),且培养液中总 DMSP 浓度主要受藻细胞密度影响;而对于三角褐指藻这类 DMSP 的中等生产者而言,不同氮营养盐浓度及类型对藻单细胞 DMSP 生产均有显著影响( $P<0.05$ ),其培养液中总 DMSP 主要受单细胞 DMSP 含量影响。在不同 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度下,低 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度(0 μmol/L)培养组单细胞 DMSPp 平均含量为高 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>浓度(1 764 μmol/L)培养组的 11 倍;在不同氮营养盐类型条件下,NaNO<sub>3</sub> 培养液中总 DMSPp 平均浓度分别为 NH<sub>4</sub>Cl 和 CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O 培养组的 3~4 倍。这可能是由于 DMSP 在赫氏颗石藻和三角褐指藻细胞中的生理机制存在差异造成的。本研究可为认识不同氮营养盐浓度及类型对不同藻中 DMSP 含量的影响提供科学参考。

### 参 考 文 献

- CHALLENGER F, SIMPSON M I. Studies on biological methylation. Part XII. A precursor of the dimethyl sulphide evolved by *Polysiphonia fastigiata*. Dimethyl-2-carboxyethylsulphonium hydroxide and its salts. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1948, 1591-1597
- CHARLSON R J, LANGNER J, RODHE H. Sulphate aerosol and climate. Nature, 1990, 348(6296): 22
- GALÍ M, DEVRED E, LEVASSEUR M, et al. A remote sensing algorithm for planktonic dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and an analysis of global patterns. Remote Sensing of Environment, 2015, 171: 171-184
- GRÖNE T, KIRST G O. The effect of nitrogen deficiency, methionine and inhibitors of methionine metabolism on the DMSP contents of *Tetraselmis subcordiformis* (Stein). Marine Biology, 1992, 112: 497-503
- GUILLARD R R L, RYTHER J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8: 229-239
- HATAKEYAMA S, OKUDA M, AKIMOTO H. Formation of sulfur dioxide and methanesulfonic acid in the photooxidation of dimethyl sulfide in the air. Geophysical Research Letters, 1982, 9(5): 583-586
- JIAN S, ZHANG H H, YANG G P, et al. Variation of biogenic dimethylated sulfur compounds in the Changjiang River Estuary and the coastal East China Sea during spring and summer. Journal of Marine Systems, 2019, 199: 103222
- JIAN S, ZHANG H H, ZHANG J, et al. Spatiotemporal distribution characteristics and environmental control factors of biogenic dimethylated sulfur compounds in the East China Sea during spring and autumn. Limnology and Oceanography, 2018, 63(S1): S280-S298
- KELLER M D, BELLOWS W K, GUILLARD R R L. Dimethyl

- sulfide production in marine phytoplankton. *Biogenic Sulfur in the Environment*, 1989, 393: 167–182
- KELLER M D, KIENE R P, MATRAI P A, *et al.* Production of glycine betaine and dimethylsulfoniopropionate in marine phytoplankton. II. N-limited chemostat cultures. *Marine Biology*, 1999, 135(2): 249–257
- KIENE R P, LINN L J, BRUTON J A. New and important roles for DMSP in marine microbial communities. *Journal of Sea Research*, 2000, 43(3/4): 209–224
- KIENE R P, SLEZAK D. Low dissolved DMSP concentrations in seawater revealed by small-volume gravity filtration and dialysis sampling. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2006, 4(4): 80–95
- KIRST G O, THIEL C, WOLFF H, *et al.* Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in icealgae and its possible biological role. *Marine Chemistry*, 1991, 35(1/2/3/4): 381–388
- LANA A, BELL T G, SIMÓ R, *et al.* An updated climatology of surface dimethylsulfide concentrations and emission fluxes in the global ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 2011, 25(1): 1–17
- 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
- LI L X, CUI Z G, QU K M, *et al.* High dimethylsulfoniopropionate concentrations in the surface seawater over the marginal seas of China and the Northwest Pacific Ocean during May–July of 2021 following La Niña. *Marine Pollution Bulletin*, 2023, 194: 115335
- LOVELOCK J E, MAGGS R J, RASMUSSEN R A. Atmospheric dimethyl sulphide and the natural sulphur cycle. *Nature*, 1972, 237(5356): 452–453
- MCPARLAND E L, WRIGHT A, ART K, *et al.* Evidence for contrasting roles of dimethylsulfoniopropionate production in *Emiliania huxleyi* and *Thalassiosira oceanica*. *New Phytologist*, 2020, 226(2): 396–409
- QIAO L, CHANG Z Q, LI J, *et al.* Comparison of phytoplankton community diversity in the ecological aquaculture system of a marine pond using morphological analysis and high-throughput sequencing. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 32–43 [乔玲, 常志强, 李健, 等. 基于形态学和高通量测序的海水池塘生态养殖系统中浮游植物多样性比较. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 32–43]
- REES A P, WOODWARD E M S, ROBINSON C, *et al.* Size-fractionated nitrogen uptake and carbon fixation during a developing coccolithophore bloom in the North Sea during June 1999. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2002, 49(15): 2905–2927
- SONG B, WARD B B. Molecular cloning and characterization of high-affinity nitrate transporters in marine phytoplankton 1. *Journal of Phycology*, 2007, 43(3): 542–552
- SPIELMEYER A, GEBSER B, POHNERT G. Dimethylsulfide sources from microalgae: Improvement and application of a derivatization-based method for the determination of dimethylsulfoniopropionate and other zwitterionic osmolytes in phytoplankton. *Marine Chemistry*, 2011, 124(1/2/3/4): 48–56
- STEFELS J, STEINKE M, TURNER S, *et al.* Environmental constraints on the production and removal of the climatically active gas dimethylsulphide (DMS) and implications for ecosystem modelling. *Biogeochemistry*, 2007, 83: 245–275
- SUN C C, WU W T, LIU J, *et al.* Contribution of freshwater aquaculture for nitrogen and phosphorus production in the Changjiang River and its impact on estuarine environment. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(1): 35–46 [孙策策, 吴文涛, 刘军, 等. 淡水养殖对长江氮磷输出的贡献及其河口环境效应. *渔业科学进展*, 2023, 44(1): 35–46]
- SUNDA W G, HARDISON R, KIENE R P, *et al.* The effect of nitrogen limitation on cellular DMSP and DMS release in marine phytoplankton: Climate feedback implications. *Aquatic Sciences*, 2007, 69: 341–351
- SUNDA W G, PRICE N M, MOREL F M M. Trace metal ion buffers and their use in culture studies. *Algal Culturing Techniques*, 2005, 4: 35–63
- SUNDA W, KIEBER D J, KIENER P, *et al.* An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae. *Nature*, 2002, 418(6895): 317–320
- VAN DUYL F C, GIESKES W W C, KOP A J, *et al.* Biological control of short-term variations in the concentration of DMSP and DMS during a *Phaeocystis* spring bloom. *Journal of Sea Research*, 1998, 40(3/4): 221–231
- WATTS M C. Lagrangian modelling of the marine nitrogen and sulphur cycles. University of East Anglia, 1999
- WITTEK B, CARNAT G, TISON J L, *et al.* Response of dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and dimethylsulfoxide (DMSO) cell quotas to salinity and temperature shifts in the sea-ice diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Polar Biology*, 2020, 43: 483–494
- YANG G P, ZHUANG G C, ZHANG H H, *et al.* Distribution of dimethylsulfide and dimethylsulfoniopropionate in the Yellow Sea and the East China Sea during spring: Spatio-temporal variability and controlling factors. *Marine Chemistry*, 2012, 138: 21–31
- ZHANG W Y, GAO B Y, LI A F, *et al.* Effects of different culture conditions on growth and accumulation of bioactive components by *Phaeodactylum tricornerutum*. *Marine Sciences*, 2016, 40(5): 57–65 [张文源, 高保燕, 李爱芬, 等. 不同培养条件对三角褐指藻生长及其生物活性成分积累的影响. *海洋科学*, 2016, 40(5): 57–65]
- ZHOU M J, YAN T, ZHOU J Z. Preliminary analysis of the characteristics of red tide areas in Changjiang River Estuary and its adjacent sea. *Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(7): 1031–1038



## Effect of Different Nitrogen Nutrients on DMSP Content in *Emiliana huxleyi* and *Phaeodactylum tricornutum*

LI Lingxiao<sup>1,2</sup>, SUN Jing<sup>3</sup>, SONG Ruohan<sup>1,2</sup>, CUI Zhengguo<sup>2</sup>, QU Keming<sup>2</sup>,  
WANG Qingkui<sup>1①</sup>, ZHOU Mingying<sup>2</sup>, CUI Hongwu<sup>2</sup>, HU Qingjing<sup>2①</sup>

(1. College of Fishery, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Key Laboratory of Marine Fisheries and Sustainable Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China; 3. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Yantai 264006, China)

**Abstract** Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) is one of the most important organic sulfur compounds on Earth, and its significance in global sulfur cycling and climate regulation cannot be overlooked, as it plays an indispensable role in these processes. Phytoplankton are the major producers of DMSP in the marine environment, and nitrogen nutrients are key factors influencing the production of DMSP in phytoplankton. This study focused on two algal species, *Emiliana huxleyi* (a high DMSP producer) and *Phaeodactylum tricornutum* (a medium DMSP producer), and conducted indoor culture experiments to compare and analyze the content of particulate DMSP (DMSPp) in the algal culture media under different nitrogen nutrient concentrations and types. The study investigated the relationships between overall DMSPp content, algal density, and DMSPp content per individual algal cell. The results indicated that different nitrogen nutrient concentrations and types had a minimal impact on the content of DMSPp per individual cell in *E. huxleyi* ( $P>0.05$ ), suggesting that the DMSPp concentration in the culture media was mostly influenced by algal cell density. Conversely, different nitrogen nutrient concentrations and types had a significant impact on the content of DMSPp per individual cell in *P. tricornutum* ( $P<0.05$ ), indicating that the DMSPp concentration in the culture media was mainly influenced by the content of DMSPp per individual algal cell. For instance, in the case of *P. tricornutum*, the average DMSPp content per individual cell in the low  $\text{NO}_3^-$  concentration ( $0 \mu\text{mol/L}$ ) culture group was 11 times greater than that in the high  $\text{NO}_3^-$  concentration ( $1\ 764 \mu\text{mol/L}$ ) culture group. Furthermore, under different nitrogen nutrient types, the average total DMSPp concentration in  $\text{NaNO}_3$  culture media was three and four times higher than that in the  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  culture groups, respectively. These differences may be attributed to variations in the physiological effects of DMSP on different algal species.

**Key words** Dimethylsulfoniopropionate; *Emiliana huxleyi*; *Phaeodactylum tricornutum*; Nitrogen nutrient

① Corresponding author: WANG Qingkui, E-mail: wangqk@tjau.edu.cn; HU Qingjing, E-mail: huqj@ysfri.ac.cn