

N、P 营养盐对塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 生长的影响

张玉娟, 曹宇, 王朝晖*, 韩博平, 杨宇锋

(暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632)

摘要: 模拟自然海水营养盐浓度状况, 在 N、P 浓度分别为 10–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ N 和 0.74–74 $\mu\text{g L}^{-1}$ P 时, 研究 N、P 双因子限制(N、P 浓度同时降低, N:P 固定为 15:1)及单因子限制(保持 N 或 P 为最高浓度, 只降低一种营养盐浓度)对有毒赤潮藻塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 生长的影响。结果表明, 塔玛亚历山大藻细胞能较快进入对数生长期, 但 N、P 双因子限制能明显影响其生长, 在 N、P 浓度分别低于 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ N 和 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ P 时, 细胞密度无明显增长; 而 N 或 P 分别受限时, 生长态势明显优于 N、P 同时受到限制的试验组, 而且 N、P 单因子中度限制对生长影响较小。结果说明塔玛亚历山大藻对单因子营养元素限制较强的适应能力, 可使其在常常出现单营养因子限制的自然水体中维持一定生长速率和细胞密度, 并有助于滤食该藻的贝类体内麻痹性贝类毒素的积累。

关键词: 塔玛亚历山大藻; 赤潮; N; P; 比生长速率

中图分类号: Q949.205

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)06-0482-05

Effects of Limitation of Nitrogen and Phosphorus on the Growth of *Alexandrium tamarense*

ZHANG Yu-juan, CAO Yu, WANG Zhao-hui*, HAN Bo-ping, YANG Yu-feng

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: In order to evaluate the growth of *Alexandrium tamarense*, a toxic harmful algal bloom species, under nitrate and phosphate limitation, five test groups of both N and P limitation (N: 500–10 $\mu\text{g L}^{-1}$, P: 74–1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, N:P=15:1) and nine test groups of only N or P limitation (N: 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, P: 74–0.74 $\mu\text{g L}^{-1}$ and P: 74 $\mu\text{g L}^{-1}$, N: 500–5 $\mu\text{g L}^{-1}$) were set under laboratory conditions. Though cells of *A. tamarense* multiplied exponentially just in the second day after inoculation in most test groups, the growth was obviously inhibited when both N and P limited simultaneously, and the cell densities did not show significant increase under N and P concentrations below 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ N and 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ P. However, cells grew significantly better in test groups of single nutrient element limitation than those under both N and P depletion. Furthermore, the growth of *A. tamarense* was affected less by moderate N or P limitation. The results suggested that the high ability of *A. tamarense* to adapt single nutrient limitation allows this harmful species to maintain constant growth rate and cell density in natural sea water, in which single nutrient limitation usually occurs, and thus helps shellfishes, feeding on *A. tamarense*, to accumulate paralytic shellfish poisoning (PSP).

Key words: *Alexandrium tamarense*; Red tide; Nitrogen; Phosphorus; Specific growth

收稿日期: 2006-01-20 接受日期: 2006-07-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40306020) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)是世界广布性有毒赤潮藻类,由其引发的赤潮曾在世界各地海域多次发生^[1-2],而且该藻是产生麻痹性贝毒(paralytic shellfish poisoning, PSP)的主要藻类之一,产生的 PSP 毒素可通过滤食而在贝类动物体内累积,既影响了近海贝类养殖业的生产,同时也威胁着人类的健康与生命安全,因而引起了各国政府的高度重视和社会各界的普遍关注。由于食用染毒贝类而造成人类中毒甚至死亡的事件在世界各地时有报道^[3-4]。我国从浙江沿海一直到福建、台湾沿海和南海大亚湾都曾发生过有毒藻毒素造成的贝类中毒事件,据统计目前已有 1800 多人中毒,至少造成 30 多人死亡^[5-6]。

亚历山大藻营养细胞广泛分布于我国沿海,长江口海域 2002 年和 2004 年春都发生了大规模的亚历山大藻赤潮^[7],而其生活史的一个重要环节—休眠孢囊在我国四大海区的沉积物中均有发现^[8]。可见,亚历山大藻在我国沿海的分布越来越广,所造成的危害必将日趋扩大。

在实验室条件下,已有报道研究了温度、光照强度以及营养物质等环境条件对亚历山大藻的生长和产毒的影响^[9-17];此外,也有亚历山大藻及其孢囊的分布、种群动态及引发赤潮的环境条件等方面的研究报道^[8,17-18],为进一步认识赤潮发生的机理提供了依据。虽然国内外有关营养盐浓度对亚历山大藻生长的影响报道较多,但所设置的 N、P 浓度多局限于较高浓度($f/2$ 加富培养基水平)的单因子限制试验,与自然海水中的 N、P 浓度相差较大。本研究参考了我国近岸海域一些养殖内湾海水的常年营养盐水平,设置了接近自然状况的营养盐浓度,研究了 N、P 双因子限制以及单因子限制对塔玛亚历山大藻生长的影响,旨在了解适合塔玛亚历山大藻生长和快速增殖的营养盐条件,为亚历山大藻赤潮的防治及 PSP 毒素的预防提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 藻种来源及培养

塔玛亚历山大藻由国家海洋局第三海洋研究所提供。试验藻种培养所用培养基中的 N、P 浓度均采用了实验所设置的最高浓度($500 \mu\text{g L}^{-1}$ N, $74 \mu\text{g L}^{-1}$ P),其余元素与 $f/2$ 培养基中相同。培养温度为 $20 \pm 1^\circ\text{C}$,光照强度为 $4\ 000 \text{ Lx}$,光暗比为 12 h:

12 h。实验前,反复转接藻种并培养 3-4 个周期,使细胞达到同步生长^[19]。

实验时,在 100 ml 三角瓶内盛 60 ml 培养基,每瓶接种 1 ml 左右的处于对数期的藻细胞,使实验培养液里初始藻密度为 100 或 $250 \text{ cells ml}^{-1}$ 左右(双因子试验中初始细胞密度约为 $100 \text{ cells ml}^{-1}$,单因子试验中约为 $250 \text{ cells ml}^{-1}$),各实验组均设有 3 个重复。

1.2 实验设置

1.2.1 N、P 双因子限制对亚历山大藻生长的影响

在 N:P=15:1(原子比)时,设置 5 个 N、P 浓度梯度,各组 N、P 浓度含量见表 1,其中 I 组为对照组,II、III 为 N、P 中度限制组,IV、V 为 N、P 极度限制组。N、P 分别以 NaNO_3 和 KH_2PO_4 配制,其余元素与 $f/2$ 培养基中相同。

表 1 N、P 双因子限制实验不同组别的 N、P 含量
Table 1 N and P concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) in different tested groups

组别 Group	N	P
I	500	74
II	300	45
III	100	15
IV	50	7.4
V	10	1.5

1.2.2 N、P 单因子限制对亚历山大藻生长的影响

N、P 单因子限制是在 N、P 浓度分别固定为 $500 \mu\text{g L}^{-1}$ N 和 $74 \mu\text{g L}^{-1}$ P 条件下,改变 P 或 N 浓度,以考察 P 限制或者是 N 限制对亚历山大藻生长的影响。N、P 浓度的设置见表 2,其中 N1、N2 和 P1、P2 分别为 N、P 中度限制组,N3、N4 以及 P3、P4 分别为 N、P 极度限制组。

1.3 结果观察

每隔一定时间吸取一定量(0.1-0.4 ml)的藻细胞培养液,置于 1 ml 浮游植物计数框内,加入适量蒸馏水稀释,并用 1 滴福尔马林固定,在 OLYMPUS BH-2 显微镜下观察计数藻细胞数目。N、P 双因子限制实验进行 48 d,前 16 d 每隔 2 d 计数一次,16-24 d 每隔 4 d 计数一次,24-48 d 每隔 6 d 计数一次。单因子限制实验进行 30 d,前 10 d 每隔 2 d 计数一次,10-30 d 每隔 4 d 计数一次。

比生长速率用公式 $\mu(\text{d}^{-1}) = (\ln(N_t/N_0)) / (t_2 - t_1)$ 计算^[20],其中, N_t 和 N_0 分别为 t_2 和 t_1 时的细胞数量。比生长速率表示在 t_1 和 t_2 之间,细胞每天分裂的次数,其大小可反映细胞的分裂生长能力。

表 2 N、P 单因子限制实验组中的 N、P 浓度及 N:P
Table 2 N, P concentrations and N:P atomic ratios under
N or P limited conditions ($\mu\text{g L}^{-1}$)

组别 Group	N	P	N:P
Control	500	74	15
N1	400	74	12
N2	250	74	7.5
N3	50	74	1.5
N4	5	74	0.15
P1	500	59	19
P2	500	37	30
P3	500	7.4	150
P4	500	0.74	1496

表 3 不同 N、P 浓度下塔玛亚历山大藻的比生长速率
Table 3 Specific growth rates of *A. tamarensis* under
different nutrient conditions

试验组别 Group	I	II	III	IV	V
前 10 d 比生长速率/d Specific growth rate during the first 10 days	0.321	0.239	0.109	0.045	0.019
最大比生长速率/d Maximum specific growth rate	0.584	0.549	0.381	0.230	0.185

2 结果和分析

2.1 N、P 双因子限制对塔玛亚历山大藻生长的影响

在不同 N、P 浓度下,塔玛亚历山大藻生长曲线具有明显差异(图 1)。除营养极度限制的 V 组外,其余各组的藻细胞几乎没有经过迟滞生长期,在接种的第 2 天就迅速进入对数生长,但由于各组对数生长期的比生长速率不同,导致各试验组不同培养时期以及稳定生长期的细胞密度具有一定差异。营养盐含量较丰富的 I 组和 II 组生长速率较高(图 1 和表 3),致使这两组细胞密度明显高于其他营养盐限制试验组,而培养的第 7 天开始,这两组细胞生长开始出现差异,I 组继续保持快速生长,而 II 组生长速率则下降。III、IV 组细胞的生长趋势与 I 组和 II 组相近,只是细胞生长速率较低,最高细胞密度仅比接种密度增长了 2-4 倍。而营养盐极度缺乏的 V 组,细胞密度基本上保持在接种密度水平,而且培养后期还出现负增长。虽然不同营养盐条件下各试验组细胞生长速率各不相同,但对数生长期时间一

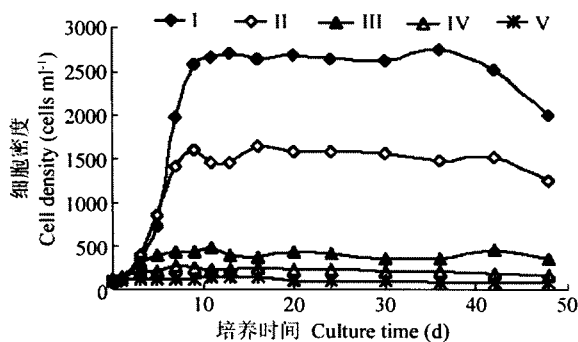


图 1 塔玛亚历山大藻在不同 N、P 浓度下的生长曲线

Fig.1 Growth curve of *A. tamarensis* under different
N and P concentrations

般维持在 7-10 d 左右(V 组除外),而稳定生长期能维持较长时间,直至 40 d 左右,细胞密度才出现下降趋势。结果说明,当 N、P 浓度低于 $100 \mu\text{g L}^{-1}$ N 和 $15 \mu\text{g L}^{-1}$ P 时,塔玛亚历山大藻生长基本上被抑制。

最大比生长速率表示细胞最大分裂速度的大小,可考察细胞最大生长分裂能力;而某一段时间内的比生长速率则可知在此期间细胞平均分裂能力。本实验中塔玛亚历山大藻的对数生长期为 7-10 d,前 10 d 的比生长速率决定了各试验组最大细胞密度以及稳定生长期的细胞密度。塔玛亚历山大藻最大比生长速率以及前 10 d 的比生长速率均随着营养盐浓度的下降而降低(表 3),虽然 I 和 II 组最大比生长速率接近,但对数生长后期比生长速率的不同使前 10 d 的比生长速率具有一定差距,最终导致两试验组稳定生长期细胞密度相差了 40%(图 1)。此外,营养盐较为丰富的 I、II、III 组的最大比生长速率均出现在第 3 天,随着营养盐的不断消耗,比生长速率逐渐降低;而营养盐缺乏的 IV、V 组最大比生长速率却出现在刚接种的第 1 天,说明低营养条件限制了亚历山大藻的生长。

2.2 单因子限制对亚历山大藻生长的影响

在 N、P 单因子实验的各试验组,细胞均能保持一定的生长,而且都能迅速进入对数生长期(图 2)。随着培养时间的延长,N 限制组(N1-N4 组)比生长速率降低,细胞密度的增长仅维持了 6-8 d,而对照组的细胞仍保持持续生长,从而使其最高细胞密度明显高于其它各 N 限制组,其余 4 组生长曲线趋势相近(图 2a)。可见 N 限制对塔玛亚历山大藻的生长具有一定影响,但 N 中度限制与 N 极度限制对生长的影响差别不明显。

在 P 限制实验中(图 2b),P 中度限制的 P1、P2 组的生长态势与对照组 C 组相差不大,而且前 4 d

的生长速度与 C 组相近,只是在第 4 天以后,细胞密度才开始显现出差别,而 P1 组在进入稳定期后的生长趋势再次与 C 组相吻合,可见 P 浓度在 59–74 $\mu\text{g L}^{-1}$ 之间时,亚历山大藻生长没有明显差别。在 P 极度限制的 P3、P4 组,虽然起始阶段细胞也具有一定的生长增殖,但对数生长期仅保持了 4 d,使稳定生长期细胞密度明显低于对照组和 P 中度限制组。

最大比生长速率和前 10 d 的比生长速率都随 N、P 浓度的下降而降低(表 4)。在 N 限制实验中,C 组的前 10 d 比生长速率明显高于其它 4 组,N1、N2、N3 组相近,而 N4 组由于对数期较短,致使其前 10 d 比生长速率明显较低。从最大比生长速率来看,C 组和 N1 组的相近,且都出现在第 4 天,而其余三组则相差不大。

在 P 限制实验中,无论是最大比生长速率还是前 10 d 比生长速率,P1、P2 组均与对照组相近,而且也与对应的 N 中度限制组 N1 和 N2 组相近。而在 P 极度限制的 P3 和 P4 组,与 N 极度限制试验组 N3、N4 组相比,不论是比生长速率还是最大细胞密度都较低。可见 P 中度缺乏对塔玛亚历山大藻生长影响较小,而极度缺乏则影响了塔玛亚历山大藻生长。

3 讨论

在本试验中,把对数生长期的塔玛亚历山大藻接种到较高营养盐浓度培养基中,可很快进入对

数生长期,且比生长速率可迅速达到最大值,可见该藻对环境变化特别是 N、P 浓度的变化具有一定的适应能力,当然这也与培养温度始终保持在 20°C 有关。有文献报道微小亚历山大藻(*A. minutum*)也能迅速进入对数生长期,其迟滞期一般为 0–5 d^[6]。塔玛亚历山大藻对 N、P 浓度变化的迅速适应,可促使其在 N、P 浓度多变的自然环境中细胞数量快速增长,并占据竞争优势。

一般来说,甲藻的生长需要消耗更多的 P^[13],因此在 P 极度限制的条件下,塔玛亚历山大藻生长受到明显抑制。但在 P 受限条件下,塔玛亚历山大藻可维持较长时间的稳定生长期(图 2b),这也许与甲藻所具有的储 P 能力有关,甲藻可以在 P 含量丰富时大量摄取 P,并储存起来,以备抵御 P 限制环境^[20]。但是当 N、P 同时受到限制时,塔玛亚历山大藻生长明显受阻(图 1),由此可推测 N 限制可影响塔玛亚历山大藻对储备 P 的利用。

本研究所设置的营养盐浓度模拟了富营养化养殖内湾自然海水水平,结果显示塔玛亚历山大藻比生长速率和最大细胞密度均随 N、P 浓度的减小而下降,说明在自然海水营养水平下,营养盐限制对塔玛亚历山大藻生长具有一定影响。而且 N、P 双因子限制对塔玛亚历山大藻生长的影响明显大于单因子限制,即使单因子限制条件下的单一营养盐

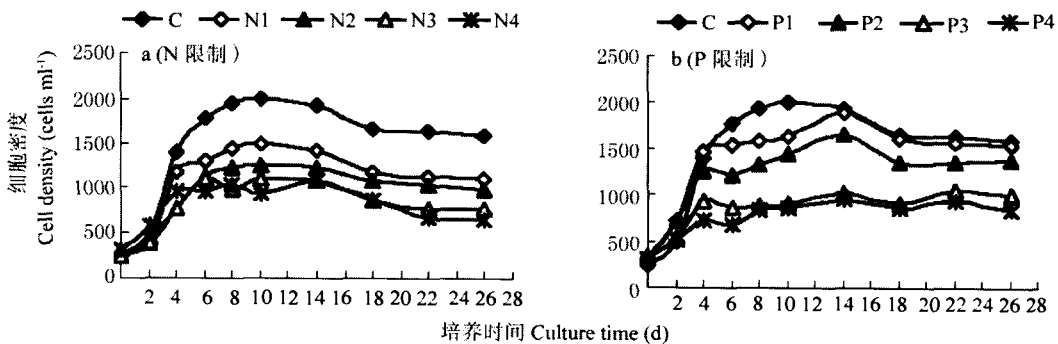


图 2 N、P 单因子限制条件下塔玛亚历山大藻的生长曲线
Fig. 2 Growth curve of *A. tamarense* under N or P limitation

表 4 不同 N、P 浓度下亚历山大藻的比生长速率
Table 4 Specific growth rates of *A. tamarense* under different nutrient conditions

试验组别 Group	C	N1	N2	N3	N4	P1	P2	P3	P4
前 10 d 比生长速率/d Specific growth rate during the first 10 days	0.217	0.177	0.167	0.154	0.107	0.165	0.152	0.104	0.105
最大比生长速率/d Maximum specific growth rate	0.512	0.555	0.308	0.334	0.293	0.423	0.410	0.269	0.261

浓度低于双因子限制, 生长速度仍然高于双因子限制。由于不同浮游植物对营养元素利用和消耗程度不同, 自然水体中常常会发生一种营养元素受到限制的情况, 如硅藻赤潮能消耗大量的 N 和 Si, 赤潮消退之后常常引起水体中 N 和 Si 的缺乏。可见, 单一营养盐限制普遍存在于自然水体中。塔玛亚历山大藻是产生 PSP 毒素的主要物种, 能在较低细胞密度下使贝类积累 PSP 毒素^[10], 该藻对单因子营养盐限制强的适应能力以及短暂的迟滞期, 使其能在 N、P 浓度多变和单一营养元素限制的自然海水中, 维持一定生长速率, 并保持一定的细胞密度, 从而促使滤食该藻的贝类体内积累 PSP 毒素。

致谢 国家海洋局第三海洋研究所顾海峰博士提供藻种, 谨致谢忱。

参考文献

- [1] Chen Y Q(陈月琴), Qiu X Z(邱小忠), Qu L H(屈良鹤), et al. Analysis of molecular biogeographic marker on red tide toxic *Alexandrium tamarense* in the South China Sea [J]. Ocean Limnol Sin (海洋与湖沼), 1999, 30(1):45-51. (in Chinese)
- [2] Lin Y S(林元烧). Red tide caused by a marine toxic dinoflagellate, *Alexandrium tamarense* (Lebour) Baleon, in shrimp ponds in Xiamen [J]. Ocean Taiwan Strait(台湾海峡), 1996, 15 (1):16-18. (in Chinese)
- [3] Dale B, Yentsch C M. Red tide and paralytic shellfish poisoning [J]. Oceanus, 1978, 21:41-49.
- [4] Hallegraeff G M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase [J]. Phycologia, 1993, 32:79-99.
- [5] Tseng C K, Zhou M, Zou J. Toxic phytoplankton studies in China [A]. In: Smayda T J, Shimizu Y. Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea [C]. Amsterdam: Elsevier, 1993. 651-656.
- [6] Zhou M J, Li J, Luckas B, et al. A recent shellfish toxin investigation in China [J]. Mar Pollut Bull, 1999, 39:331-334.
- [7] Ye S F(叶属峰), Ji H H(纪焕红), Cao L(曹恋), et al. Red tides in the Yangtze River Estuary and adjacent sea areas: causes and mitigation [J]. Mar Sci (海洋科学), 2004, 28 (5):26-32. (in Chinese)
- [8] Gu H F(顾海峰), Lan D Z(蓝东兆), Fang Q(方琦), et al. Distribution and germination of *Alexandrium* sp. cysts in coastal areas of Southeast China Sea [J]. Chin J Appl Ecol (应用生态学报), 2003, 14(7):1147-1150. (in Chinese)
- [9] Deng G(邓光), Li Y G(李夜光), Hu H J(胡鸿钧), et al. Effects of temperature, light and pH on photosynthesis, and of light-dark cycle on growth rate and biomass of *Scrippsiella trochoidea* and *Alexandrium tamarense* [J]. J Wuhan Bot Res (武汉植物学研究), 2004, 22(2):129-135. (in Chinese)
- [10] Yan T(颜天), Zhou M J(周名江), Qian P Y(钱培元). Study on the combined effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. Acta Oceanol Sin (海洋学报), 2002, 24(2):114-120. (in Chinese)
- [11] Jang T J(江天久), Huang W J(黄伟建), Wang Z H(王朝晖), et al. Effects of water temperature, salinity and PH on growth and toxicity of *Alexandrium tamarense* (Lebour) balech (Dapeng Strain) [J]. Chin J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报), 2000, 6 (2):151-154. (in Chinese)
- [12] Zhang Y H(张宜辉), Lian Y W(连玉武). Effects of phosphorus on the growth of the red tide organism *Alexandrium tamarense* [J]. Mar Environ Sci (海洋环境科学), 1999, 18(4):24-27. (in Chinese)
- [13] Shi Y J(石岩峻), Hu H H(胡晗华), Ma R Y(马润宇), et al. Nitrogen and phosphorus absorption and growth characteristics of *Alexandrium tamarense* [J]. Chin J Appl Ecol (应用生态学报), 2003, 14(7):1143-1146. (in Chinese)
- [14] Wang D Z, Hsieh D P H. Effects of nitrate and phosphate on growth and C2 toxin productivity of *Alexandrium tamarense* CI01 in culture [J]. Mar Pollut Bull, 2002, 45:286-289.
- [15] Wang D Z, Hsieh D P H. Growth and toxin production in batch cultures of a marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* HK9301 isolated from the South China Sea [J]. Harm Algae, 2005, 4:401-410.
- [16] Deng F H, Lu Y H. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum* [J]. Toxicon, 2000, 38:1491-1503.
- [17] Wang C H, Hsieh D P H. Nutritional supplementation to increase growth and paralytic shellfish toxin productivity by the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. Biochem Engin, 2002, 11:131-135.
- [18] Kazuhiko I, Makoto Y, Yutaka O, et al. The growth and cyst formation of a toxic dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*, at low water temperatures in northeastern Japan [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2001, 26:17-29.
- [19] Liu S D(刘士德), Zhang J H(张建华), Xu D D(徐丁丁), et al. Changes of biomass and total RNA content in *Chlamydomonas reinhardtii* after synchronized Culture [J]. Biotechnology (生物技术), 2003, 13(4):12-14. (in Chinese)
- [20] Sun J(孙军), Ning X R(宁修仁). Marine phytoplankton specific growth rate [J]. Adv in Earth Sci, 2005, 20(9):939-945. (in Chinese)
- [21] Tamiji Y, Kenji T. Growth and phosphate uptake kinetics of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from Hiroshima Bay in the Seto Inland Sea [J]. Japan Phycol Res, 1999, 47(1):27.
- [22] Wang Z H(王朝晖), Qi Y Z(齐雨藻), Li J R(李锦蓉), et al. Analysis and evaluation trophic status in aquaculture areas of Daya Bay [J]. Mar Environ Sci (海洋环境科学), 2004, 23(2):25-28. (in Chinese)