

营养盐限制条件下塔玛亚历山大藻 对东海原甲藻的化感作用研究

刘洁生*, 谢瑾, 杨维东, 李丽璇

(暨南大学生物工程学系, 广州 510632)

摘要: 为明确塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 对东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 生长的化感作用, 研究了在 N、P 限制及正常营养盐条件下 (又称富营养) 塔玛亚历山大藻无细胞滤液对东海原甲藻生长的影响, 并探讨了 3 种不同营养盐条件下两种藻共培养时的生长状况。结果表明, 半连续培养时, 营养盐限制下, 塔玛亚历山大藻无细胞滤液对东海原甲藻的生长均有一定影响。N 限制下, 5 d 后东海原甲藻藻密度显著低于未加滤液的对照组, 藻密度为 1.02×10^7 cells L⁻¹, 对照组为 1.7×10^7 cells L⁻¹; P 限制下, 东海原甲藻藻密度与对照组差异不显著, 5 d 后藻密度为 1.44×10^7 cells L⁻¹; 富营养条件下, 东海原甲藻藻密度与对照组无明显区别。共培养时, 塔玛亚历山大藻对东海原甲藻生长的抑制作用更为显著, N、P 限制下, 4 d 后东海原甲藻全部死亡, 且聚集成团形成沉淀; 富营养条件下, 仍有少量东海原甲藻存活 (藻密度 3.3×10^4 cells L⁻¹)。这表明, 塔玛亚历山大藻对东海原甲藻的生长有一定的化感作用。营养盐限制可促进塔玛亚历山大藻化感物质的合成和释放, 化感作用是塔玛亚历山大藻抑制东海原甲藻生长的原因之一。

关键词: 藻类; 塔玛亚历山大藻; 东海原甲藻; 化感作用

中图分类号: Q948.881.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)03-0207-06

Allelopathic Effect of *Alexandrium tamarense* on *Prorocentrum donghaiense* under Limited Nutrient Conditions

LIU Jie-sheng*, XIE Jin, YANG Wei-dong, LI Li-xuan

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To investigate the potential allelopathic effect of *Alexandrium tamarense* on the growth of *Prorocentrum donghaiense*, experiments were designed to co-culture both algae or to culture *P. donghaiense* with cell-free filtrate from *A. tamarense* under N- and P-limited and nutrient-sufficient (normal) conditions. The results showed that the growth of *P. donghaiense* was inhibited when semi-continuously cultured in cell-free filtrate of *A. tamarense*. Under N-limited condition, cell density of *P. donghaiense* was significantly lower than the control (without addition of filtrate) after 5 days of culture, the cell density being 1.02×10^7 cells L⁻¹, but that of control was 1.7×10^7 cells L⁻¹. Under the P-limited condition, there was no obvious difference in cell density between treated alga and the control, the cell density of treated alga being 1.44×10^7 cells L⁻¹. Under nutrient-sufficient condition, there was no difference in cell density between *P. donghaiense* and the control. In co-culture, the inhibitory effect of *A. tamarense* on *P. donghaiense* was more obvious. Under N- and P-limited conditions, *P. donghaiense* was entirely killed by *A. tamarense* after 4 days, the former gathered into groups and sank. However, a few *P. donghaiense* survived (cell density at 3.3×10^4 cells L⁻¹) under nutrient-sufficient conditions. The results suggested that

收稿日期: 2005-11-09 接受日期: 2006-03-22

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 973 项目(2001CB409710); 广东省科技计划项目(2004B20501007)资助

* 通讯作者 Corresponding author

A. tamarense have allelopathic effect on *P. donghaiense*, and the production of allelochemicals would be stimulated under N- and P-limited conditions. Thus, the inhibitory effect of *A. tamarense* might be one of the causes that suppresses the growth of *P. donghaiense*.

Key words: Algae; *Alexandrium tamarense*; *Prorocentrum donghaiense*; Allelopathy

随着工农业生产的发展和人口的增加,大量工农业废水和生活污水排入海,使河口、内湾和近岸水体水质恶化,富营养化日趋严重,赤潮发生越来越频繁,受害区域也不断扩大,赤潮已经成为全球性主要海洋灾害之一^[1]。赤潮发生过程中常常发生优势种群的演替,如 1990 年 4 月及 5 月期间大鹏湾连续发生反曲原甲藻 (*Prorocentrum sigmoides*) 赤潮和骨条藻 (*Skeletonema macostatum*) 赤潮^[2],1999 年 6 月 8 日-19 日胶州湾赤潮中出现聚生角刺藻 (*Chaetoceros socialis*) 和浮动弯角藻 (*Eucampia zodiacus*) 种群演替现象^[3]。2004 年长江口曾出现亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 与东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 赤潮共同发生的现象。

为解释赤潮发生过程中种群演替和双相赤潮爆发的内在规律,在实验室中进行有关藻类种间竞争机制的研究是一条重要途径。研究表明,许多藻类之间存在着明显的相互作用^[4],环境条件对竞争有重要影响^[5]。许多学者已就光照、盐度、起始藻密度对藻间相互作用的影响进行了许多研究。陈炳章^[6]等报道,只要赤潮生物的生长率达到一定的数值(不一定达到最高),赤潮生物在海水中达到一定的密度以后,赤潮就可以形成,通过对具齿原甲藻 (*Prorocentrum dentatum*) 和中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 生长的比较,发现这 2 种藻生长的最适温度、盐浓度范围是基本一致的,而且在同等条件下,中肋骨条藻的生长率要远远高于具齿原甲藻,成为优势藻种。但对营养盐限制下藻间竞争的研究,特别是有毒藻与非产毒藻在营养盐限制下的种间竞争的研究报道不多。

化感作用是生物在进化过程中产生的一种对环境的适应性机制,是生态系统中自然的化学调控现象。一般认为,化感物质的产生和释放是生物在环境胁迫的选择压力下形成的。最近的研究发现,赤潮藻间也存在化感作用,化感作用是藻间竞争的重要机制之一。藻间化感作用和化感物质的释放受环境因素如营养盐限制等的影响,不同营养盐条件下藻间化感作用的强度和化感物质的释放可能不

同;营养盐限制可能有利于化感物质的释放。另一方面,营养盐的水平直接影响和限制着藻类次生代谢物如毒素等的生成和分泌^[7],化感物质与毒素之间的关系并不清楚。塔玛亚历山大藻和东海原甲藻均为赤潮多发型藻类,最近有报道^[8]两种赤潮藻类可形成双相型赤潮。本文探讨 N、P 限制下共培养的塔玛亚历山大藻对东海原甲藻生长的影响,以及塔玛亚历山大藻无藻细胞滤液对东海原甲藻生长的影响,以了解塔玛亚历山大藻与东海原甲藻的竞争机制,为阐明和揭示东海原甲藻赤潮的发生、发展和消亡的机制提供参考。

1 材料和方法

材料 塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 和东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 由暨南大学吕颂辉、江天久副教授提供。

仪器 倒置生物显微镜 (CKX41, Olympus), 智能生物人工气候箱 (CD2105, Xutemp, 杭州雪中炭恒温技术有限公司)。

藻种的培养 塔玛亚历山大藻和东海原甲藻生长所用培养液为人工海水加营养盐配成的 f/2 培养液,经 0.22 μm 纤维滤膜除菌所得。培养瓶经 1.034×10⁵ Pa (121℃) 高压蒸汽灭菌 15-20 min。藻液置于温度为 20±1℃,光照强度为 4 000 lx,光暗比为 12 h: 12 h 的智能生物人工气候培养箱中驯化培养。

半连续培养 参照 Johansson 等^[9]方法。在 f/2 培养液中批量培养 10 d 后达到一定的藻细胞密度,每隔 4 d 在固定的时间从培养液中取出总培养液的 30%,按照 f/2 配方 (除 NaNO₃ 和 NaH₂PO₄·6H₂O 外) 补入等体积的营养盐,继续培养 16 d。其中 N 限制条件下半连续培养时,添加营养盐比例为 1.5:1 (N:P, 即 NaNO₃ 和 NaH₂PO₄·6H₂O 浓度分别为 7.5、5 mg L⁻¹,下同); P 限制条件下半连续培养时,添加营养盐比例为 150:1 (75、0.5 mg L⁻¹); 正常营养盐条件下 (又称为富营养条件下) 半连续培养时,添加营养盐比例为 15:1 (75、5 mg L⁻¹)。

去藻细胞滤液处理 将处于对数生长期末

期的塔玛亚历山大藻(藻密度 9.8×10^6 cells L^{-1})于 $3\ 000 \times g$ 下离心 10 min 后,收集上清液,再经 $0.2\ \mu m$ 滤膜过滤,得到塔玛亚历山大藻去藻细胞滤液。将等体积的无藻细胞滤液加入处于对数生长期的东海原甲藻(藻密度为 1.2×10^7 cells L^{-1})培养液中,按 f/2 培养基补充相应营养盐;对照组加入等体积 f/2 培养液。每组设置三个平行。显微镜下观察、计数。

共培养 分别在 N 限制、P 限制、富营养条件下半连续培养东海原甲藻和塔玛亚历山大藻各 1 000 ml, 14 d 后取 60 ml 东海原甲藻液转移至 200 ml 三角瓶中,再加入 90 ml 相应条件下半连续培养的塔玛亚历山大藻藻液,对照组加入 90 ml f/2 培养液。每组设置 3 个平行,每隔 24 h 在显微镜下用细胞计数器计数。由于在营养盐限制下藻类的生长会受到一定影响,因此 3 种不同营养盐半连续培养后,藻的起始浓度有所不同。其中 N 限制、P 限制的情况下,藻的起始密度低于富营养盐条件下的起

始密度。

2 结果和分析

2.1 塔玛亚历山大藻去藻细胞滤液对东海原甲藻生长的影响

图 1 为不同营养盐条件下塔玛亚历山大藻去藻细胞滤液对东海原甲藻生长的影响,东海原甲藻起始密度为 6.0×10^6 cells L^{-1} 。从图 1 可看出,不同营养盐条件下塔玛亚历山大藻去藻细胞滤液对东海原甲藻生长的影响不同。N 限制条件下,塔玛亚历山大藻的滤液对东海原甲藻生长的影响最大,第 5 天东海原甲藻的生长受到明显抑制 ($P < 0.05$),藻密度为 1.02×10^7 cells L^{-1} ,对照组为 1.7×10^7 cells L^{-1} ;P 限制下,塔玛亚历山大藻滤液对东海原甲藻的生长有一定影响,但并无显著性差异 ($P > 0.05$),5 d 后藻密度为 1.44×10^7 cells L^{-1} ;富营养盐条件下,东海原甲藻藻密度与对照组无明显区别 ($P > 0.05$)。

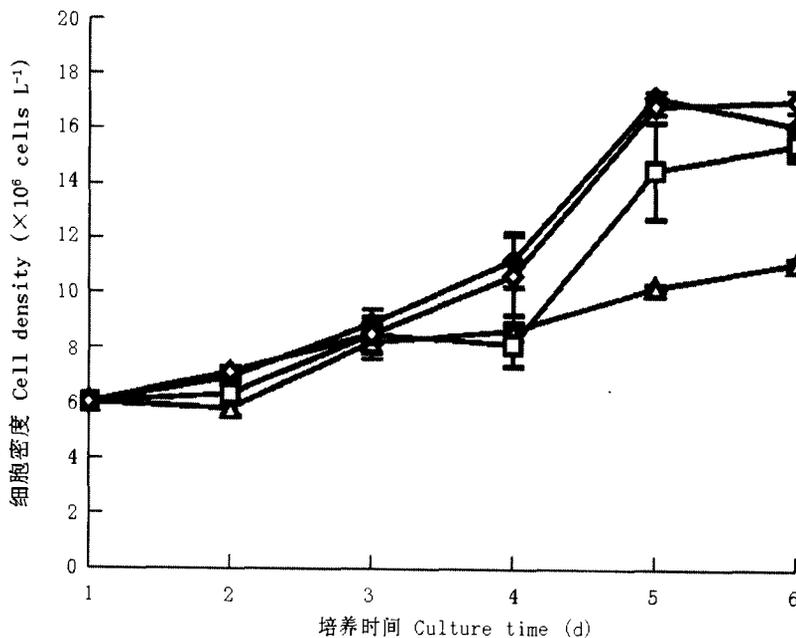


图 1 不同营养盐条件下塔玛亚历山大藻滤液对东海原甲藻生长的影响

Fig. 1 The effects of cell-free filtrate from *Alexandrium tamarense* on the growth of *Proocentrum donghaiense* under different nutrient condition

◆:对照 Control; △: N 限制 N-limited; □: P 限制 P-limited; ◇: 富营养 Normal nutrition

2.2 塔玛亚历山大藻与东海原甲藻共培养的生长情况

图 2、3 分别为不同营养盐条件下塔玛亚历山大藻与东海原甲藻共培养时的生长曲线。N 限制条件下塔玛亚历山大藻与东海原甲藻的起始藻密度

分别为 1.4×10^6 、 6.0×10^6 cells L^{-1} ; P 限制下起始藻密度分别为 1.8×10^6 、 6.0×10^6 cells L^{-1} ; 正常 f/2 营养盐条件下藻密度分别为 2.0×10^6 、 6.0×10^6 cells L^{-1} 。

从图 2 可看出, N、P 限制及富营养条件下, 单独培养与共培养时塔玛亚历山大藻的生长曲线相

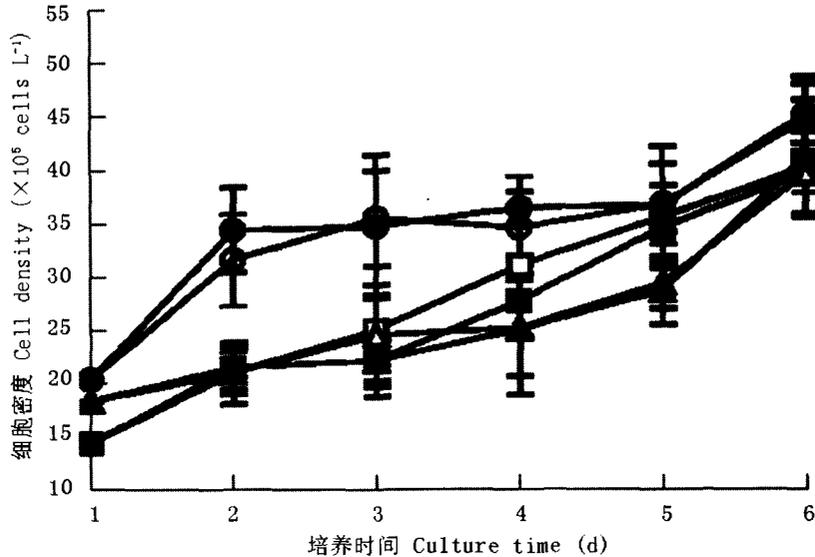


图 2 不同营养盐条件下与东海原甲藻共培养时塔玛亚历山大藻的生长曲线

Fig. 2 The growth of *A. tamarensis* co-cultured with *P. donghaiense* under different nutrient conditions

□: N 限制单独培养 N-limited cultured alone; ■: N 限制共培养 N-limited co-cultured; △: P 限制单独培养 P-limited cultured alone; ▲: P 限制共培养 P-limited co-cultured; ○: 富营养单独培养 Normal nutrition cultured alone; ●: 富营养共培养 Normal nutrition co-cultured

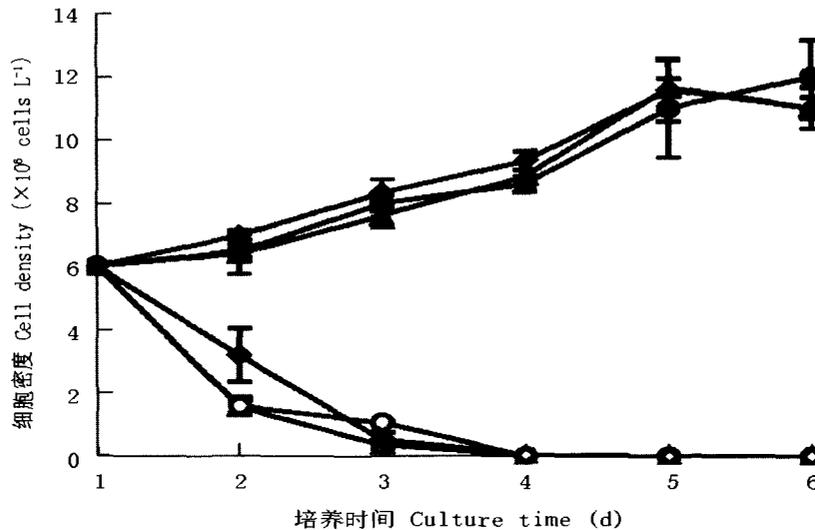


图 3 不同营养盐条件下与塔玛亚历山大藻共培养时东海原甲藻的生长曲线

Fig. 3 The growth of *P. donghaiense* co-cultured with *A. tamarensis* under different nutrient conditions

▲: N 限制单独培养 N-limited cultured alone, △: N 限制共培养 N-limited co-cultured; ●: P 限制单独培养 P-limited cultured alone, ○: P 限制共培养 P-limited co-cultured; ◆: 富营养单独培养 Normal nutrition cultured alone, ◇: 富营养共培养 Normal nutrition co-cultured.

差不多 ($P > 0.05$)。6 d 后, N 限制条件下, 单独培养与共培养时的塔玛亚历山大藻密度分别为 4.0×10^6 、 3.9×10^6 cells L^{-1} ; P 限制条件下, 分别为 4.0×10^6 、 4.1×10^6 cells L^{-1} ; 富营养条件下, 分别为 4.4×10^6 、 4.5×10^6 cells L^{-1} ($P > 0.05$)。表明塔玛亚历山大藻在共培养过程中, 其生长并未受到东海原甲藻的影响。

从图 3 可以看出, N、P 限制及富营养盐条件下, 与单独培养时比较, 共培养时东海原甲藻的生长均受到显著抑制 ($P < 0.05$)。N、P 限制时, 共培养 4 d 后东海原甲藻藻密度接近 0。显微镜下观察发现, 东海原甲藻聚集成团、下沉至底部。富营养盐条件下, 4 d 后, 藻密度只有 3.3×10^4 cells L^{-1} 。表明共培

养时,塔玛亚历山大藻对东海原甲藻的生长有明显的抑制作用,这种作用因营养盐水平的不同而有一定差异。营养盐限制条件下,抑制作用更明显。

3 讨论

赤潮藻类的生存和竞争策略与赤潮发生的机理紧密相关。在漫长的自然进化过程中,赤潮藻类发展出一系列独特的生活策略以适应环境的变化。不同的赤潮藻类对环境具有独特的适应策略,藻间竞争的策略十分复杂。近年来,许多研究指出,藻类化感作用在藻间竞争中发挥着重要作用^[9]。某些微藻能产生化感物质抑制处于同一水域的其他藻类的生长,从而克服自身在营养竞争等过程中的劣势,使自己在竞争中占优势^[4]。这是营养缺陷情况下某些藻类为了生存竞争而进行自我保护的一种普遍机制。有研究报道^[11],*Gymnodinium mikimotoi*的胞外液可显著抑制 *Heterocapsa circularisquama* 的生长;蓝细菌分泌的有毒物质会抑制硅藻的生长;*Chrysochromulina polylepis* 对 *Skeletonema costatum* 的生长存在强烈的抑制作用。塔玛亚历山大藻是一种多发型赤潮藻,目前,有关塔玛亚历山大藻与其他赤潮藻间的竞争机制还不明确,对其化感作用的研究更为有限。本实验探讨了营养盐限制条件下塔玛亚历山大藻对东海原甲藻的化感作用。

实验结果表明,N、P 限制条件下塔玛亚历山大藻的藻液以及去藻细胞滤液对东海原甲藻生长均有显著的抑制作用,这种作用远高于营养丰富条件下的情况。由此可以推测,塔玛亚历山大藻对东海原甲藻可能存在化感作用,营养盐限制可促进塔玛亚历山大藻化感物质的产生和分泌。塔玛亚历山大藻是一种有毒藻类,可产生麻痹性贝毒。有研究报道^[12],营养盐限制可促进毒素的产生。氮限制时,塔玛亚历山大藻藻细胞具有相对较高的毒素含量。磷限制时,塔玛亚历山大藻能分泌出更多的毒素^[13]。营养盐限制条件下,毒素生成与化感作用强弱的一致性提示毒素作为化感物质参与了藻间竞争。然而,一般认为麻痹性贝毒是一种胞内毒素,其作为化感物质的可能性不大,N、P 限制条件下塔玛亚历山大藻生成更多的麻痹性贝毒可能是为了增强自身抵抗摄食压力的能力^[14]。塔玛亚历山大藻化感物质的成分有待进一步的研究。

许多研究指出,胞外化感物质的分泌引致浮游

生物间的相互作用是影响浮游生物继发的一个重要因素^[12]。塔玛亚历山大藻对东海原甲藻的生长存在一定的化感作用,营养盐限制对这种化感作用有一定的刺激作用。可以设想,在东海原甲藻赤潮后期,水体中营养盐将耗竭,此时,为竞争有限的营养盐,塔玛亚历山大藻释放出大量的化感物质从而抑制东海原甲藻的生长,使东海原甲藻赤潮迅速消亡。现场水体检测发现,在东海原甲藻赤潮发生水域,常年存在一定数量的塔玛亚历山大藻^[15],其原因可能与塔玛亚历山大藻的化感作用有关。

本研究还发现,共培养时,3种营养盐条件下的塔玛亚历山大藻对东海原甲藻均可产生较强的抑制作用,且N、P 限制条件下的抑制作用与富营养盐条件下的情况非常相近,提示除了化感作用以外,塔玛亚历山大藻尚存在其他机制抑制东海原甲藻的生长。有研究表明藻类之间存在接触抑制作用^[16],具细胞壁的塔玛亚历山大藻可能对不具细胞壁的东海原甲藻产生较强的细胞接触死亡效应。我们对此正在作进一步的研究。

参考文献

- [1] Zhou M J(周名江), Zhu M Y(朱明远), Zhang J(张经). Status of harmful algal blooms and related research activities in China [J]. Chin Bull Life Sci(生命科学), 2001, 13(2):54-59.(in Chinese)
- [2] Xia B C(夏北成), Wu R H(吴仁海). Mechanism analysis on red tide outbreak in Dapeng Bay of South China Sea through phytoplankton communities change [J]. Acta Sci Nat Univ Sunyatseni(中山大学学报 自然科学版), 1996, 35(suppl):260-264.(in Chinese)
- [3] Huo W Y(霍文毅), Yu Z M(俞志明), Zou J Z(邹景忠), et al. Analysis of dynamic process and the causes of *Eucampia zoodiacus* red tide in Jiaozhou Bay [J]. J Fish China(水产学报), 2001, 25(3): 222-226.(in Chinese)
- [4] Pratt C M. Competition between *Skeletonema costatum* and *Olisthodiscus luteus* in Narragansett Bay and in culture [J]. Limnol Oceanogr, 1996, 11:447-455.
- [5] Hegarty S G, Villareal T A. Effect of light level and N:P supplyration on the competition between *Phaeocystis cf. pouchetii* (Hariot) Lagerheim (Prymnesiophyceae) and five diatom species [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1998, 226(2):241-258.
- [6] Chen B Z(陈炳章), Zhu M Y(朱明远), Wang Z L(王宗灵), et al. Effects of temperature and salinity on growth of *Prorocentrum dentatum* and comparisons between growths of *Prorocentrum dentatum* and *Skeletonema costatum* [J]. Adv Marin Sci(海洋科学进展), 2005, 23(1):60-64.(in Chinese)
- [7] Hu H H(胡晗华), Shi Y J(石岩峻), Cong W(丛威). A preliminary study of improvement in toxin production of

- Alexandrium tamarense* by regulation of nitrate concentrations [J]. Chin J Proc Engin(过程工程学报), 2005, 5(4):438-440.(in Chinese)
- [8] Wang Y(王悠), Yu Z M(俞志明), Song X X(宋秀贤), et al. Effects of macroalgae on growth of 2 species of bloom microalgae and interaction between these microalgae in laboratory culture [J]. Environ Sic(环境科学), 2006, 27(2):274-280.(in Chinese)
- [9] Johansson N, Granéli E. Influence of different nutrient conditions on cell density, chemical composition and toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) in semi-continuous cultures [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1999, 239:243-258.
- [10] Schmidt L E, Hansen P J. Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*: effect of cell concentration, growth phase and pH [J]. Mar Ecol Prog Ser, 2001, 216:67-81.
- [11] Keating K I. Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a eutrophic lake [J]. Science, 1997, 196:885-886.
- [12] Egge J K. Are diatoms poor competition at low phosphate concentration? [J] Marine Syst, 1998, 16:191-198.
- [13] Riegman R. Nutrient related selection mechanisms in marine phytoplankton communities and the impact of eutrophication on the planktonic food web [J]. Water Sci Techn, 1995, 32:63-75.
- [14] Dong Y W(董云伟), Dong S L(董双林), Liu X Y(刘相义). The effect of initial cell density on the population competition between *Alexandrium tamarense* Balech and *Heterosigma akashiwo* Hada [J]. Period Ocean Univ China (Nat Sci)(中国海洋大学学报 自然科学学报), 2004, 34(6):964-968.(in Chinese)
- [15] 李嘉. 多种水产品含有毒成分 [N]. 华夏时报·华夏网, 2004-5-15.
- [16] Chen B Z(陈炳章), Zhu M Y(朱明远), Wang Z L(王宗灵), et al. Adaptive and competitive strategies of red tide algae [J]. Marin Environ Sci(海洋环境科学), 2005, 24(1):70-74.(in Chinese)