

# 混合培养条件下几种赤潮藻对无机磷源的竞争生长研究

欧林坚<sup>1</sup>, 黄邦钦<sup>2</sup>, 齐雨藻<sup>1</sup>

(1. 暨南大学 赤潮与水环境研究中心, 广东 广州 510632; 2. 近海海洋环境国家重点实验室, 厦门大学 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

**摘要:**采用批次培养方式, 研究混合培养的几种赤潮藻东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)与中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)及东海原甲藻与链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)对溶解无机磷源的竞争生长响应。结果表明, 在富磷及贫磷的培养条件下, 中肋骨条藻的比生长率远超过东海原甲藻, 而成为培养体系中的绝对优势种。在东海原甲藻与链状亚历山大藻的混合培养体系中, 原甲藻大量死亡, 可能存在亚历山大藻对原甲藻的他感作用。培养体系中, 碱性磷酸酶活性随藻类磷胁迫而显著升高, 可能在后期种群利用代谢有机磷源时发挥重要作用, 且在不同培养体系中表现出酶活性大小及状态的差异性, 该结果可能影响浮游植物对有机磷源的利用效率。

**关键词:**赤潮藻; 溶解无机磷; 竞争生长; 碱性磷酸酶; 溶解有机磷

**中图分类号:** Q175

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3096(2009)06-0041-05

在自然环境下, 不同种类的浮游植物生活在同一生境中, 共同竞争有限的资源。近几年来, 长江口赤潮高发区连续在春季爆发大规模的东海原甲藻赤潮(*Prorocentrum donghaiense*)<sup>[1]</sup>。2002年5月, 爆发了东海原甲藻和链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)的混合型赤潮<sup>[2]</sup>。连续几年来的3月份, 在该海域均发生了中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)等硅藻赤潮, 之后的5月份演替为原甲藻赤潮; 中肋骨条藻赤潮往往在原甲藻赤潮衰亡以后的6~8月爆发<sup>[3]</sup>。每年的春季, 长江口径流携带大量的磷营养盐入海, 此外, 通过台湾海峡暖流也可能给长江口赤潮高发区带来大量的磷源<sup>[4]</sup>。在磷限制的长江口赤潮高发区, 磷营养盐的改变可能对海区浮游植物的群落演替及最终的赤潮形成产生影响<sup>[5]</sup>。

作者采取批次培养的方式, 研究混合培养的东海原甲藻与链状亚历山大藻, 东海原甲藻与中肋骨条藻对富磷及贫磷的生长响应, 探讨无机磷源的改变可能对长江口赤潮高发区浮游植物群落演替及原甲藻赤潮形成产生的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计

东海原甲藻和链状亚历山大藻分离自长江口, 由暨南大学吕颂辉教授提供。中肋骨条藻分离自厦门港, 由厦门大学高亚辉教授提供。按约1:1的细胞比例分别将处于磷饱和条件下指数期生长的东海原甲藻和中肋骨条藻, 东海原甲藻和链状亚历山大藻

混合接种至已灭菌处理的玻璃培养缸中, 进行批次培养。以f/2培养基为基础, 调整磷酸盐浓度, 分别设计富磷组(f/2的磷酸盐)及贫磷组(f/20的磷酸盐), 实验设计如表1所示。每天正午12:00采样。

### 1.2 样品分析

浮游植物细胞用鲁哥氏碘液固定, 在显微镜下计数。

采用磷钼蓝显色法在分光光度计下检测溶解无机磷(DIP)(Spectrum, 722E)<sup>[6]</sup>。采用荧光分光光度计(Shimadzu, RF-5301PC)检测碱性磷酸酶活性(APA)<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 磷酸盐含量变化

培养体系中起始DIP浓度见表1。随着培养时间的延长, DIP被藻类大量消耗(图1)。在实验第2天, 贫磷条件下PS-L2及PA-L2中的DIP已低于检出限。富磷条件下PS-H1和PA-H1中, DIP分别在实验第4天和第5天下降趋势减缓。实验末期, PS-H1和PA-H1中的DIP分别为4.6 μmol/L和6.4 μmol/L。

收稿日期: 2008-12-26, 修回日期: 2009-04-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(40806058); 广东省自然科学基金项目(7300662)

作者简介: 欧林坚(1979-), 女, 福建闽清人, 讲师, 博士, 主要从事海洋微藻的生理生态研究, 电话: 020-85223334, E-mail: torangeou@jun.edu.cn

表 1 混合培养条件下起始接种细胞密度及磷酸盐浓度

Tab. 1 Initial cell numbers and dissolved inorganic phosphorus (DIP) concentrations in co-exist incubation experiment

培养方式	东海原甲藻和 中肋骨条藻	东海原甲藻和 中肋骨条藻	东海原甲藻和 链状亚历山大藻	东海原甲藻和 链状亚历山大藻
细胞数目( $\times 10^5$ 个/L)	原甲藻:3.8 骨条藻:4.7	原甲藻:4.7 骨条藻:4.2	原甲藻:4.0 链状亚历山大藻:5.9	原甲藻:4.5 链状亚历山大藻:5.0
DIP ( $\mu\text{mol/L}$ )	30.7	1.3	30.5	1.5
编号	PS-H1	PS-L2	PA-H1	PA-L2

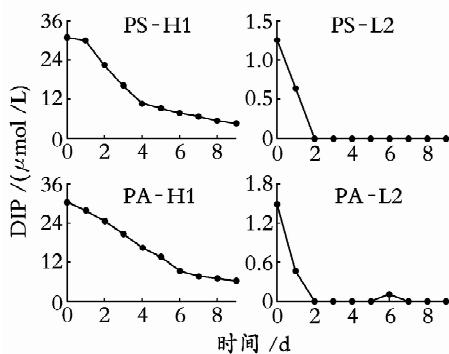


图 1 混合培养条件下无机磷浓度的变化

Fig. 1 Variation of dissolved inorganic phosphorus (DIP) in co-exist incubation experiment

## 2.2 细胞的生长

不论是富磷还是贫磷的培养体系中,从实验早期始,中肋骨条藻的细胞数目就远远超过了东海原甲藻。除了实验的前两天外,骨条藻细胞数目始终占总细胞数目的 95% 以上(图 2a)。

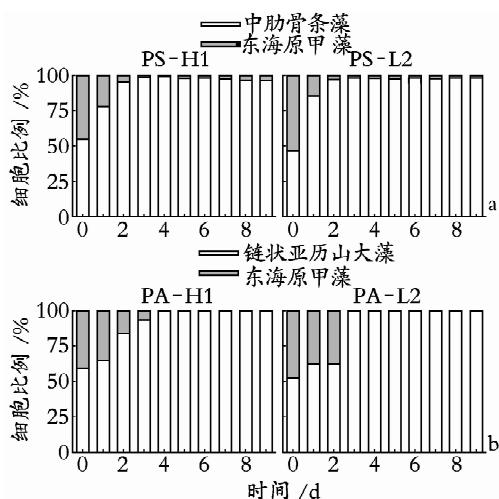


图 2 混合培养条件下的不同藻种占总细胞数量的比例

Fig. 2 Variation of percentages of cell numbers of different species in co-exist incubation experiment

富磷的 PS-H1 中,骨条藻细胞数目在第 4 天达到最高值  $559.3 \times 10^6$  个/L,此后细胞数目急剧下降,在实验后期骨条藻细胞数目稳定在  $100.0 \times 10^6$  个/L 左右;东海原甲藻则在实验第 5 天达到细胞的最大值  $32.0 \times 10^6$  个/L,在实验末期,东海原甲藻细胞数目维持在  $3.7 \times 10^6$  个/L。在贫磷的 PS-L2 中,中肋骨条藻细胞数目亦在第 4 天达到最大值  $138.0 \times 10^6$  个/L,此后细胞数目逐渐减少,在实验后期,骨条藻细胞数目稳定在  $70.0 \times 10^6$  个/L;东海原甲藻细胞数目在实验的第 2 天即达到最大值  $1.8 \times 10^6$  个/L(图 3)。

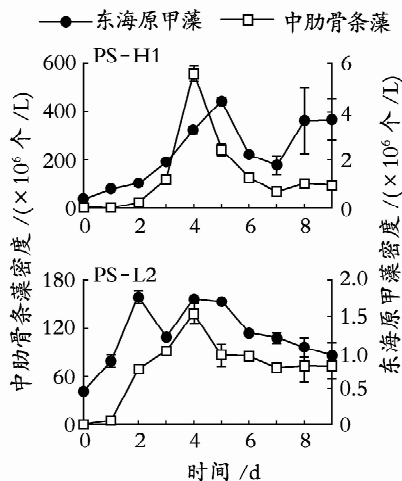


图 3 混合培养的东海原甲藻与中肋骨条藻细胞数目的变化

Fig. 3 Variation of cell numbers of *P. donghaiense* and *S. costatum* in co-exist incubation experiment

比较富磷及贫磷条件下东海原甲藻与中肋骨条藻的比生长率(表 2),结果表明,在两种培养基中,骨条藻的比生长率都显著高于东海原甲藻( $P < 0.01, < 0.05$ )。比较两种藻在不同磷浓度下的比生长率,虽然两种藻在贫磷情况下的比生长率都略高于富磷的情况,但不存在显著差异( $P > 0.05$ )。

表 2 混合培养条件下藻细胞比生长率的变化

Tab. 2 Variation of growth rates in co-exist incubation experiment of *P. donghaiense* & *S. costatum* (PS) and *P. donghaiense* & *A. catenella* (PA)

编号	种类	比生长率 (/d)					平均值±S. D.
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	
PS-H1	东海原甲藻	1.1	0.7	0.8	0.8	0.7	0.8±0.2
	中肋骨条藻	2.6	2.8	2.7	2.6	-	2.7±0.1
PS-L2	东海原甲藻	0.9	1.0	-	-	-	0.9±0
	中肋骨条藻	3.7	3.7	2.6	2.1	-	3.3±0.6
PA-H1	东海原甲藻	-	-	-	-	-	-
	链状亚历山大藻	-	0.9	0.7	0.7	0.6	0.7±0.2
PA-L2	东海原甲藻	-	-	0.2	-	-	-
	链状亚历山大藻	0.5	0.6	0.7	0.6	-	0.6±0.1

无论是在富磷或是贫磷的培养基中,东海原甲藻都竞争不过链状亚历山大藻,在实验的早期阶段即大量死亡(图 2b,图 4)。富磷的 PA-H1 中,链状亚历山大藻细胞数目随培养时间逐渐增加,平均比生长率达到 0.7 /d ±0.2/d(表 2),至实验末期,亚历山大藻的细胞数目达到  $8.5 \times 10^6$  个/L。而在贫磷的 PA-L2 中,亚历山大藻比生长率达到 0.6/d±0.1/d(略低于富磷条件下的比生长率,但不存在显著差异,  $P > 0.05$ ),在实验第 4 天,细胞即进入平稳期,细胞数目达到  $2.5 \times 10^6$  个/L。

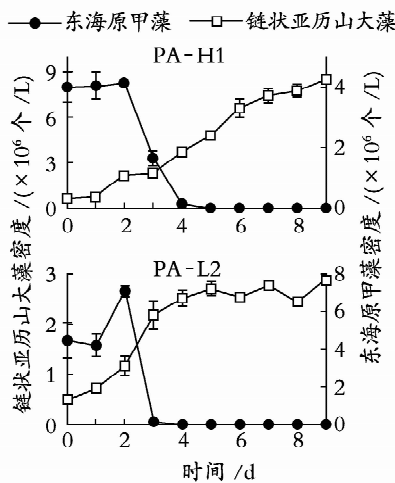


图 4 混合培养的东海原甲藻与链状亚历山大藻细胞数目的变化

Fig. 4 Variation of cell numbers of *P. donghaiense* and *A. catenella* in co-exist incubation experiment

### 2.3 碱性磷酸酶活性(APA)变化

从图 5 看出,在贫磷情况下,PS-L2 及 PA-L2 中 APA 从实验的早期阶段迅速升高,并在实验后期基本保持稳定。PS-L2 及 PA-L2 中 APA 最高可分别达到 161.71,149.10 nmol/(L·h)。而在富磷的 PS-H1 与 PA-H1 中,在实验早期阶段,APA 均低于检出限,只是到了中、后期,可检测到几个 nmol/(L·h)的 APA。

比较贫磷条件下混合培养的不同藻种游离态 APA 变化(图 6),东海原甲藻与中肋骨条藻混和培养的 PS-L2 中,游离态 APA 从实验早期即迅速上升,在整个实验过程中,游离态 APA 对总 APA 的贡献显著。而在东海原甲藻和链状亚历山大藻混合培养的 PA-L2 中,游离态 APA 则是随着培养时间的延长逐渐增加。

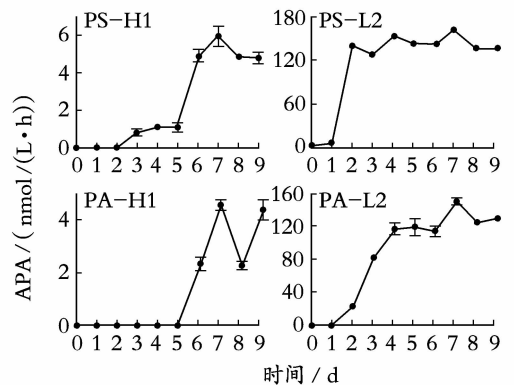


图 5 混合培养条件下碱性磷酸酶活性变化

Fig. 5 Variation of alkaline phosphatase activity (APA) in co-exist incubation experiment

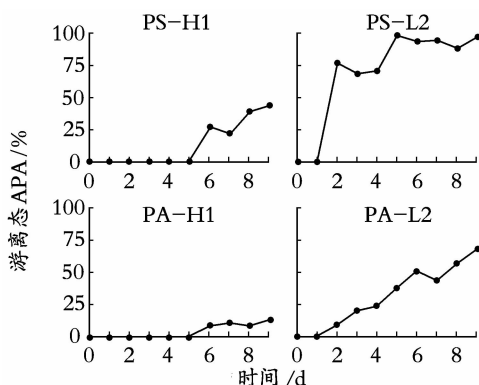


图6 混合培养条件下游离态碱性磷酸酶活性所占比重的变化  
Fig. 6 Variation of percentage of free alkaline phosphatase activity (APA) in co-exist incubation experiment

### 3 讨论

#### 3.1 无机磷酸盐在浮游植物种间竞争中的作用

多数研究者认为,硅藻的比生长率显著高于甲藻<sup>[8]</sup>。在单种培养的情况下,中肋骨条藻的比生长率为2.0~4.3/d,海洋原甲藻的比生长率为1.2/d,微小原甲藻的比生长率为0.78~0.90/d<sup>[9]</sup>。Ou等<sup>[10]</sup>认为,在富磷的情况下,中肋骨条藻相对于东海原甲藻和链状亚历山大藻具有较高的比生长率,属于生长策略者。在本研究中,混合培养的情况下也得到相似的结果。中肋骨条藻比生长率达到2.1~3.7/d,东海原甲藻的比生长率为0.7~1.1/d。中肋骨条藻的比生长率显著高于东海原甲藻( $P < 0.05$ )。相对于东海原甲藻,中肋骨条藻作为具有高比生长率的生长策略者,在获得充分的营养盐的情况下,能迅速成为优势种。此结果与李瑞香等<sup>[3]</sup>的结果是一致的。

相对于东海原甲藻,中肋骨条藻具有高亲和力的磷酸盐吸收系统,属于亲和力策略者<sup>[10]</sup>。在贫磷的情况下,当实验的第2天DIP低于检出限后,东海原甲藻即停止生长,而中肋骨条藻仍能保持一定的比生长率继续生长。该结果表明,在贫磷的情况下,中肋骨条藻对无机态的正磷酸盐具有较高的亲和力,能摄取东海原甲藻已无法摄取到的磷酸盐,继续维持生长。当然,该结果也不排除另一种可能性,即中肋骨条藻内部的磷库强于东海原甲藻。已有的研究表明,中肋骨条藻单位细胞的最低磷含量( $Q_{P0} = 0.012 \text{ pmol/个}$ )远小于东海原甲藻( $Q_{P0} = 0.12 \text{ pmol/个}$ ),细胞平均分裂一次所需的磷量,远少于原甲藻。中肋骨条藻 $Q_{Pmax}/Q_{P0}$ 可达到80.83,高于东海原甲藻的11.08,在贫磷的情况下,骨条藻能利用内部的磷库继续维持高速的生长<sup>[10]</sup>。

在东海原甲藻与链状亚历山大藻富磷、贫磷的混合培养实验中,进入第4、5天,东海原甲藻全部死亡。前期研究表明,东海原甲藻对磷酸盐的亲和力( $K_s = 1.73 \text{ } \mu\text{mol/L}$ )甚至高于链状亚历山大藻( $K_s = 2.28 \text{ } \mu\text{mol/L}$ )<sup>[10]</sup>,应该不存在东海原甲藻因无法竞

争获得磷酸盐而导致细胞死亡的可能性。Smayda<sup>[8]</sup>认为,甲藻为了弥补高 $K_s$ 的不足,发展出了4种主要的适应机制,其中一项为通过释放他感物质提高种群的竞争能力。Cloern等<sup>[11]</sup>认为,浮游植物为了防止被捕食,发展出一系列特异性的化学、形态学和行为学上的防御方式,如一些甲藻(链状裸甲藻 *Gymnodinium catenatum*、亚历山大藻)能够生成代谢产物阻止桡足类的捕食行为。Kubanek等<sup>[12]</sup>认为,赤潮种短凯伦藻(*Karenia brevis*)具有他感能力(Allelopathy),能够通过最大化他感物质的浓度来抑制竞争者的生长,最小化藻华中藻类竞争者的他感物质产生的几率,从而成为一个成功的竞争策略者。在混合培养的环境中,链状亚历山大藻是否可能释放有毒、有害的化学物质,随着亚历山大藻细胞数目的增加,释放的化学物质浓度升高,从而导致东海原甲藻的细胞死亡,或者链状亚历山大藻通过细胞个体的接触,直接导致东海原甲藻的死亡,该假设还有待进一步研究、证实。

通过以上结果,研究者认为,当海区同时存在东海原甲藻和中肋骨条藻,且细胞都保持较高活性的情况下,海区无机形态磷营养盐的改变不可能是导致原甲藻取代骨条藻成为优势种的重要原因。

#### 3.2 碱性磷酸酶在典型赤潮藻营养竞争中发挥的作用

碱性磷酸酶(AP)是浮游植物在磷胁迫的状态下,诱导表达的一种胞外酶,APA被广泛应用于指示海区磷胁迫或限制状态<sup>[13]</sup>。在富磷的PS-H1和PA-H1中,实验前期,基本检测不到APA,只是到了实验的中后期,随着藻类细胞生理活性的降低,藻细胞的大量死亡,部分磷酸酶释放到水体中,在培养基中能检测到几个 $\text{nmol}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 的APA。该结果表明典型赤潮藻在磷饱和的情况下,基本不表达AP。而在贫磷的PS-L2与PA-L2中,浮游植物感受到磷胁迫,APA迅速上升到高值。此外,在骨条藻与原甲藻混合培养的PS-L2中,游离态APA从实验早期即占据总APA的大部分;而原甲藻与亚历山大藻混合培养的PA-L2中,游离态APA比例随着培养时间的延长而逐渐增大。该结果表明,这3种藻释放AP的行为存在差异,相较于亚历山大藻,骨条藻、原甲藻倾向于将诱导产生的AP迅速释放到水体中。

在对溶解有机磷源(DOP)的利用中,AP无疑发挥着重要的作用。经研究表明,海区中DOP主要是由生物来源的多聚磷、核苷酸、核酸和单磷酸脂等组成<sup>[14]</sup>。其中,单磷酸脂占据DOP的75%<sup>[15]</sup>。而AP主要的水解对象正是单磷酸脂,糖磷、线性多聚磷和核苷酸等,APA至少能水解10%~50%的DOP<sup>[14]</sup>。

东海原甲藻等甲藻赤潮往往发生在中肋骨条藻赤潮之后。而在中肋骨条藻赤潮的衰亡期,骨条藻往往会释放大量的代谢有机物质。在东海原甲藻与中肋骨条藻的竞争中,无机磷酸盐不起决定作用的情况下,是否有有机形态磷酸盐能够影响其种间竞争,是下一步的研究工作。

## 4 结论

相对于东海原甲藻,中肋骨条藻具有较高的比生长率。无论在富磷还是贫磷的培养条件下,中肋骨条藻都能够竞争过东海原甲藻成为优势种。链状亚历山大藻对东海原甲藻的生长可能具有他感作用,导致东海原甲藻的死亡。碱性磷酸酶在磷胁迫条件下大量表达,能水解水体中的 DOP,可能在后期种群对代谢产物有机磷源的竞争中起重要作用。

### 参考文献:

- [1] 周名江,朱明远. 我国近海有害赤潮发生的生态学、海洋学机制及预测防治研究进展 [J]. 地球科学进展, 2006, **21**(7): 673-679.
- [3] 周名江,颜天,邹景忠. 长江口邻近海域赤潮发生区基本特征初探 [J]. 应用生态学报, 2003, **14**(7): 1 031-1 038.
- [3] 李瑞香,朱明远,王宗灵,等. 东海两种赤潮生物种间竞争的围隔实验 [J]. 应用生态学报, 2003, **14**(7): 1 049-1 054.
- [4] 石晓勇,王修林,韩秀荣,等. 长江口邻近海域营养盐分布特征及其控制过程的初步研究 [J]. 应用生态学报, 2003, **14**(7): 1 086-1 092.
- [5] Huang B Q, Ou L J, Wang X L, *et al.* Alkaline phosphatase activity of phytoplankton in East China Sea coastal waters with frequent HAB occurrences [J]. *Aquatic Microb Ecol*, 2007, **49**: 195-206.
- [6] 国家海洋局. 海洋监测规范 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2007. 109-121.
- [7] Huang B Q, Ou L J, Hong H S, *et al.* Bioavailability of dissolved organic phosphorus compounds to typical

- harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu [J]. *Mar Pollut Bull*, 2005, **51**: 838-844.
- [8] Smayda T J. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea [J]. *Limnol Oceanogr*, 1997, **42**(5): 1 137-1 153.
- [9] Furnas M J. In situ growth rates of marine phytoplankton: approaches to measurement, community and species growth rates [J]. *J Plankton Res*, 1990, **12**(6): 1 117-1 151.
- [10] Ou L J, Wang D, Huang B Q, *et al.* Comparative study on phosphorus strategies of three typical harmful algae in Chinese coastal waters [J]. *J Plankton Res*, 2008, **30**(9): 1 007-1 017.
- [11] Cloern J E, Dufford R. Phytoplankton community ecology: principles applied in San Francisco Bay [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 2005, **285**: 11-28.
- [12] Kubanek J, Hicks M, Naar J, *et al.* Does the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* use allelopathy to out-compete other phytoplankton? [J]. *Limnol Oceanogr*, 2005, **50**(3): 883-895.
- [13] Cembella A D, Antia N J, Harrison P J. The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part 1 [J]. *CRC Crit Rev Microbiol*, 1984, **10**(4): 317-391.
- [14] Karl D M, Yanagi K. Partial characterization of the dissolved organic phosphorus pool in the oligotrophic North Pacific Ocean [J]. *Limnol Oceanogr*, 1997, **42**(6): 1 398-1 405.
- [15] Benitez-Nelson C R. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems [J]. *Earth-Sci Rev*, 2000, **59**: 109-135.

## Research on competing growth of some harmful algae to phosphate in co-exist bath incubation

OU Lin-jian<sup>1</sup>, HUANG Bang-qin<sup>2</sup>, QI Yu-zao<sup>1</sup>

(1. Research Center for Harmful Algae and Aquatic Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science and Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Dec. , 26, 2008

**Key words:** harmful algae; dissolved inorganic phosphorus; competing growth; alkaline phosphatase activity; dissolved organic phosphorus

**Abstract:** The co-exist batch incubation experiment of harmful algae *Prorocentrum donghaiense* & *Skeletonema costatum* (PS) and *P. donghaiense* & *Alexandrium catenella* were carried out to study the competing growth response of these species to phosphate. The results showed that the growth rate of *S. costatum* was far higher than that of *P. donghaiense* whatever in the P-rich or in the P-scarce condition and became the absolutely dominant species. While in the co-exist culture of *P. donghaiense* and *A. catenella*, *P. donghaiense* went death and this might be due to the allelopathy of *A. catenella*. Alkaline phosphatase activity (APA) increased greatly with P stress and might play an important role in controlling population competition via hydrolyzing metabolized dissolved organic phosphorus in the latter period.

(本文编辑:张培新)