

强壮前沟藻(*Amphidinium carterae* Hulbert)在多重逆境条件下的生长和生理响应*

张珍妮^{1,2} 姜玥璐^{1,2①} 李曼璐^{1,2} 魏鹏骥^{1,2}

(1. 清华大学 深圳研究生院海洋学部 深圳 518055; 2. 清华大学 环境学院 北京 100084)

摘要 尽管单一逆境条件对浮游植物产生的影响已被广泛重视,然而对于多重逆境条件对藻细胞生长生理的研究仍有空白。本研究通过测定强壮前沟藻(*Amphidinium carterae* Hulbert)光密度(OD₇₅₀)、叶绿素 *a* 含量(chl *a*)、光合作用效率(F_v/F_m)、碳氮比(C/N)等多个生理指标,分析其在 9 种环境下(常温光照、低温和低温黑暗三种物理环境,结合全营养、缺氮、缺磷三种营养状态)对多重逆境的生长和生理响应。研究表明,在多重逆境条件下,单一物理逆境因素(低温或黑暗)较氮限制或磷限制对藻细胞生长和生理的不利影响更为显著。营养限制并同低温环境双重作用对生物量和碳氮比产生显著性影响($P < 0.01$)。此外,低温和黑暗条件耦合作用下,SYTOX Green 染色强度处于较低水平,chl *a* 稳定、 F_v/F_m 有所升高,强壮前沟藻在逆境环境下作为群体的衰亡得以缓解。

关键词 强壮前沟藻; 低温环境; 黑暗环境; 氮限制; 磷限制; 多重逆境

中图分类号 P7

doi: 10.11693/hyhz20160300068

浮游植物是海洋中主要的初级生产者,为全球贡献了约 40%的初级生产力,在海洋生态系统中有着不可替代的地位(Bidle *et al*, 2004; Jiang *et al*, 2014)。浮游植物的生长和死亡,不仅受到来自细胞群体外部的海洋环境,如光、温度、盐度、营养盐等物理化学条件和捕食者、真菌、病毒等生物条件的影响,同时也受到种群内彼此之间的影响(Vidoudez *et al*, 2008; Ianora *et al*, 2010),使浮游植物细胞作为群体处于一种生与死的动态平衡中(Redfield, 1958; Falkowski *et al*, 1998)。

强壮前沟藻(*Amphidinium carterae* Hulbert)是一种能产生溶血性毒素的有害赤潮藻种(冀晓青等, 2012)。除了韩笑天等(2004)从生长率和细胞形态入手,对强壮前沟藻在不同环境下的生长特性进行了研究之外,国内对不同环境条件下强壮前沟藻的生理生化过程的研究很少。尽管单一逆境条件对浮游植物生长生理变化的影响已被广泛研究,然而,自然环境中常见的多重逆境条件(如大面积赤潮灾害引起的海水

营养盐匮乏,浮游植物下沉到海洋底层黑暗低温环境,以及随时可能遭遇的温度突变等)对浮游植物的影响研究却相对匮乏。根据现有的研究成果,无法对浮游植物群落演替和海洋生态环境变化的关系进行合理的预测与控制(郭匿春, 2007)。

本文希望通过研究多重逆境条件(黑暗、低温、氮限制和磷限制)对强壮前沟藻细胞的生理、生化影响,估测其对多重逆境条件的生理生态响应。

1 材料与方法

1.1 藻种培养

强壮前沟藻(CCMA-279)购自厦门大学近海海洋国家重点实验室海洋藻类保种中心。藻种保存在 *f/2* 培养基无硅配方中(*f/2*-Si)(Guillard *et al*, 1962),培养温度为(20±1)°C,光照条件为 80 μmol photon/(m²·s),光周期 L/D=14:10。实验用海水为经过 0.22 μm 滤膜过滤的大亚湾冬季海水,盐度为 33,

* 国家自然科学基金青年科学基金项目, 41506129 号; 清华大学自主科研计划项目, 20131089253 号; 深圳市科技计划项目, KQCX201533115153644 号, JCYJ20150529164918736 号。张珍妮, 硕士研究生, E-mail: zzn13@mails.tsinghua.edu.cn

通讯作者: 姜玥璐, 硕士生导师, 讲师, E-mail: jiang.yuelu@sz.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2016-03-27, 收修改稿日期: 2016-05-25

海水及所用培养器皿均经高压灭菌(121°C, 20min), 保持实验藻种单种培养。培养过程中, 通过过滤空气(4258 Acro50 空气过滤器, PALL, 美国)曝气防止培养基碳限制及细胞沉降的发生, 并将 pH 维持在 8.0—8.2。

1.2 实验条件设计

如表 1 所示, 本次实验设定了 9 种培养条件, 包括三种物理环境: 常温、低温、低温+黑暗; 以及三种营养条件: 营养充足(f/2-Si)、缺氮(f/2-Si-N)、缺磷

(f/2-Si-P); 不同的物理环境结合不同的营养条件, 得到对照组, 以及单重或多重逆境条件下的实验组。当藻细胞浓度达到对数生长末期时, 在 20°C 下以 2500g 转速离心 15min(台式冷冻离心机 Allegra X-15R, Beckman Coulter, 美国), 经无菌海水清洗两次后再悬浮于相应的培养基中: 对照组(f/2-Si)、缺氮(f/2-Si-N)、缺磷(f/2-Si-P)。并分别放置于三种不同培养环境中(表 1), 每个实验条件下设三个平行样, 将开始分组实验的当天记为第 0 天。

表 1 实验条件设置
Tab.1 Experimental Conditions

组别	培养基	温度(°C)	光周期	
常温组	CON(常温对照)	f/2-Si	20	10:14
	CON-N(常温缺氮)	f/2-Si-N	20	10:14
	CON-P(常温缺磷)	f/2-Si-P	20	10:14
低温组	CL(低温对照)	f/2-Si	10	10:14
	CL-N(低温缺氮)	f/2-Si-N	10	10:14
	CL-P(低温缺磷)	f/2-Si-P	10	10:14
低温黑暗组	CD(低温黑暗对照)	f/2-Si	10	0:24
	CD-N(低温黑暗缺氮)	f/2-Si-N	10	0:24
	CD-P(低温黑暗缺磷)	f/2-Si-P	10	0:24

1.3 分析方法

1.3.1 藻液光密度和生长速率测定 本次研究中用藻液光密度对强壮前沟藻种群的生物量(沈萍等, 2001)进行观测, 以空白培养基作为对照, 使用分光光度计(UV-1780, Shimadzu, 日本)测试强壮前沟藻细胞在 750 波长下光密度(OD₇₅₀), 按下列公式计算其生长速率:

$$\mu = (\ln X_t - \ln X_0) / (t - t_0)$$

式中 μ 代表生长速率, X_t 代表实验进行到第 t 天时藻细胞的 OD₇₅₀, X_0 代表实验进行到第 0 天时藻细胞的 OD₇₅₀(Sriharan *et al.*, 1990)。

1.3.2 叶绿素 *a* 测定 藻液经玻璃纤维滤膜(GF/F, Whatman, 英国)过滤, 于 -20°C 冷冻保存。叶绿素 *a* 含量(chl *a*)经 90% 丙酮低温 4°C 黑暗提取 16h 后利用分光光度计(UV-1780, Shimadzu, 日本)测定(Maxwell, 1984)。

1.3.3 光合作用效率测定 采集后的样品避光保存 15min, 用 PHYTO-PAM(Walz, 德国)测试光合系统 II 最大光化学量子产量(F_v/F_m), 操作过程避光。

1.3.4 SYTOX Green 荧光染色 SYTOX Green (SYTOX® Green Nucleic Acid Stain S7020, Thermo Fisher, 美国)作为一种细胞染料, 可以对不同膜透性

的细胞进行不同程度的染色, 由于死亡细胞膜透性远大于活细胞, 从而可以用于死细胞鉴别(Jauzein *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014)。在藻细胞液中加入 SYTOX Green 染色剂(最终浓度为 5×10^{-5} mol/L), 样品置于 96 孔板, 于室温黑暗放置 10min 后测量荧光值, 激发光波长为 480nm(多功能酶标仪 SpectraMax i3x, Molecular Devices, 美国)。

1.3.5 碳、氮含量测定 藻液用 GF/F 玻璃纤维滤膜(预先于 550°C 灼烧 12h)过滤收集后, 于 -20°C 储存。在 60°C 烘干后用元素分析仪(Vario MACRO cube, Elementar, 德国)测定碳、氮含量, 并计算碳氮比(C/N 摩尔比)。

1.4 数据处理与分析

实验数据用 SPSS 21.0 进行统计分析, 采用 2-way ANOVA Analysis ($P < 0.05$) 对多因素逆境胁迫条件下的实验结果进行分析, 检测单一及两种耦合逆境条件对藻细胞生理生化变化的影响, 找出显著影响因素并检测两因素之间是否存在显著相关效应。

2 结果与分析

2.1 多重逆境条件对强壮前沟藻生长的影响

从图 1 可见, 低温组的 OD₇₅₀ 下降最为明显, 在

第 5 天, 营养充足(CL)、氮限制(CL-N)和磷限制实验组 (CL-P) 分别下降至 (0.17±0.03)、(0.17±0.01) 和 (0.21±0.02), 而此时常温光照和低温黑暗环境中这三种营养条件下的 OD₇₅₀ 分别是低温组的 1.4—3 倍和 1.4—1.8 倍。

通过 Two-way ANOVA 分析显示(表 2 所示), 单独低温逆境并没有对 OD₇₅₀ 造成显著性影响 ($P=0.316$), 而营养限制条件(缺氮、缺磷)($P<0.05$)、黑暗条件($P<0.001$)以及低温和营养限制两种逆境条件同时发生时($P<0.01$)对 OD₇₅₀ 有显著影响。

强壮前沟藻在常温条件下, 营养充足和磷限制时, 生长速率分别为(0.01±0.02)和(0.02±0.02)/天, 而其它逆境实验组(CON-N、CL、CL-N、CL-P、CD、CD-N、CD-P)的生长速率皆为负值。常温氮限制条件(CON-N)下细胞生长速率为(-0.06±0.01); 低温组的三种营养盐条件下细胞生长速率分别为(-0.19±0.06)/天(CL)、(-0.17±0.02)/天(CL-N)和(-0.12±0.02)/天(CL-P); 低温黑暗组三种营养盐条件下细胞生长速率分别为(-0.07±0.00)/天(CD)、(-0.08±0.01)/天(CD-N)和(-0.05±0.00)/天(CD-P)(表 3)。

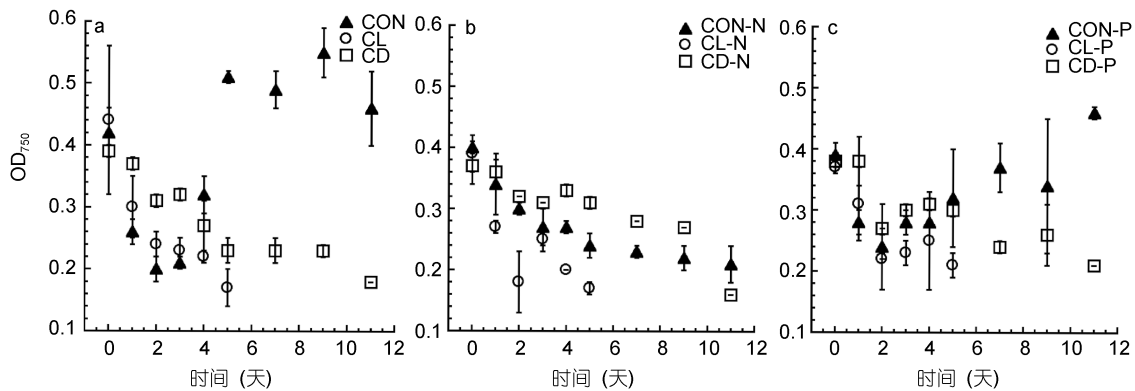


图 1 常温(CON)、低温(CL)和低温黑暗(CD)条件对强壮前沟藻 OD₇₅₀ 值的影响

Fig.1 The effect of normal condition (CON), low temperature (CL) and cold dark environment (CD) on the OD₇₅₀ of *Amphidinium carterae*

注: a. 营养充足情况下; b. 氮限制情况下; c. 磷限制情况下

表 2 营养、低温和黑暗条件对强壮前沟藻生长和生理生化影响的 Two-way ANOVA 分析

Tab. 2 Two-way ANOVA analysis on the effect of nutrients, low temperature and darkness on the growth and physiological and biochemical changes of *Amphidinium carterae*

条件	OD ₇₅₀	chl <i>a</i>	F _v /F _m	SYTOX	C/N
营养	*	NS	NS	NS	*
低温	NS	NS	***	***	NS
黑暗	***	***	***	***	NS
营养×低温	**	NS	NS	NS	**
营养×黑暗	NS	NS	NS	NS	NS

注: NS 表示无显著影响; *代表 $P<0.05$; **代表 $P<0.01$; ***代表 $P<0.001$

2.2 多重逆境条件对强壮前沟藻叶绿素和光合作用效率的影响

低温黑暗环境下强壮前沟藻的 chl *a* 浓度高于其它常温组及低温组, 在第 11 天, 三种营养条件下 chl *a* 浓度分别为(109.03 ± 5.43)μg/L(CD)、(155.97 ± 8.43)μg/L(CD-N)和(213.90 ± 18.09)μg/L(CD-P)。而低温光照环境下强壮前沟藻的 chl *a* 持续下降, 不论营

表 3 常温(CON)、低温(CL)和低温黑暗(CD)条件下强壮前沟藻的生长速率

Tab. 3 Growth Rate of *Amphidinium carterae* in normal condition (CON), low temperature (CL) and cold dark environment (CD)

组别	时间	生长速率(/天)
常温组	CON	第 0—11 天 0.01±0.02
	CON-N	第 0—11 天 -0.06±0.01
	CON-P	第 0—11 天 0.02±0.00
低温组	CL	第 0—5 天 -0.19±0.06
	CL-N	第 0—5 天 -0.17±0.02
	CL-P	第 0—5 天 -0.12±0.02
低温黑暗组	CD	第 0—11 天 -0.07±0.00
	CD-N	第 0—11 天 -0.08±0.01
	CD-P	第 0—11 天 -0.05±0.00

养条件如何 chl *a* 五天内全部下降至 10μg/L 以下(图 2)。根据 Two-way ANOVA 分析(表 2), 黑暗对 chl *a* 的浓度产生显著性影响($P<0.001$), 而营养限制条件、低温, 以及低温和营养限制条件、黑暗和营养限制条件一同发生, 对 chl *a* 浓度无显著性影响(P 值均>0.05)。

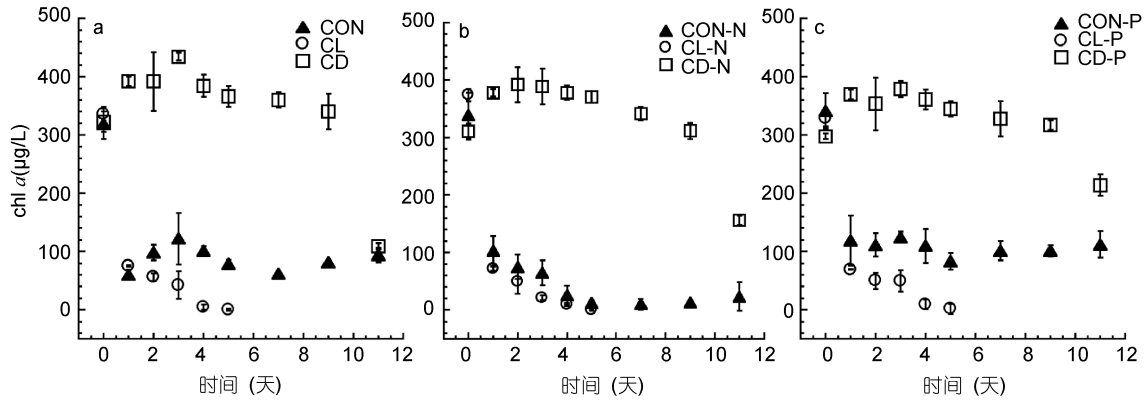


图2 常温(CON)、低温(CL)和低温黑暗(CD)条件对强壮前沟藻 chl *a* 值的影响

Fig.2 The effect of normal condition (CON), low temperature (CL) and cold dark environment (CD) on the Chl*a* of *Amphidinium carterae*

注: a. 营养充足情况下; b. 氮限制情况下; c. 磷限制情况下

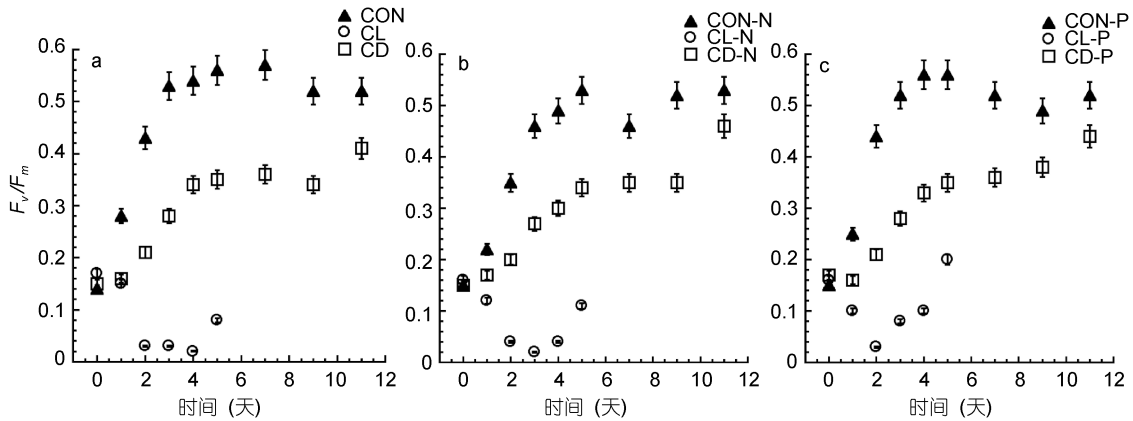


图3 常温(CON)、低温(CL)和低温黑暗(CD)条件对强壮前沟藻 F_v/F_m 值的影响

Fig.3 The effect of normal condition (CON), low temperature (CL) and cold dark environment (CD) on the F_v/F_m of *Amphidinium carterae*

注: a. 营养充足情况下; b. 氮限制情况下; c. 磷限制情况下

营养充足条件下常温组(CON) F_v/F_m 值最高, 经过短暂的较低水平后, 第3天升高为 (0.53 ± 0.02) 后较为稳定。常温光照条件下的氮限制(CON-N)和磷限制(CON-P)实验组 F_v/F_m 值仅次于对照组, 低温黑暗条件下强壮前沟藻的 F_v/F_m 虽然最终低于对照组, 但呈现缓慢上升趋势且较为稳定。而低温光照条件下实验组的 F_v/F_m 最低。Two-way ANOVA 分析表明(表2), 单一低温条件或黑暗条件会对 F_v/F_m 产生显著性影响 ($P < 0.001$), 而其它逆境条件不会对 F_v/F_m 有显著性影响 (P 值均 > 0.05)。

2.3 SYTOX Green 染色结果

低温黑暗条件下营养充足、氮限制和磷限制实验组的 SYTOX Green 值最低, 即死亡藻细胞较少。而低温光照条件下的 SYTOX Green 值要高于其它条件

下的实验组, 即死亡藻细胞较多。单一低温、黑暗环境条件对 SYTOX Green 染色结果有显著性影响 ($P < 0.001$, 见表2)。

2.4 多重逆境条件对强壮前沟藻颗粒碳含量和氮含量的影响

常温光照环境下的实验组颗粒有机碳(particulate organic carbon, POC)、颗粒有机氮(particulate organic nitrogen, PON)较高, 而在低温环境中无论是有光照还是黑暗环境, POC 都有所下降。与其它实验组相比, 低温黑暗环境实验组的 POC、低温光照环境实验组的 PON 降低最为明显。而从 C/N 摩尔比来看, 无论营养条件如何, 低温黑暗实验组的 C/N 比最低。营养条件以及营养和低温耦合条件会对 C/N 产生显著性影响 ($P < 0.05$)(表2)。

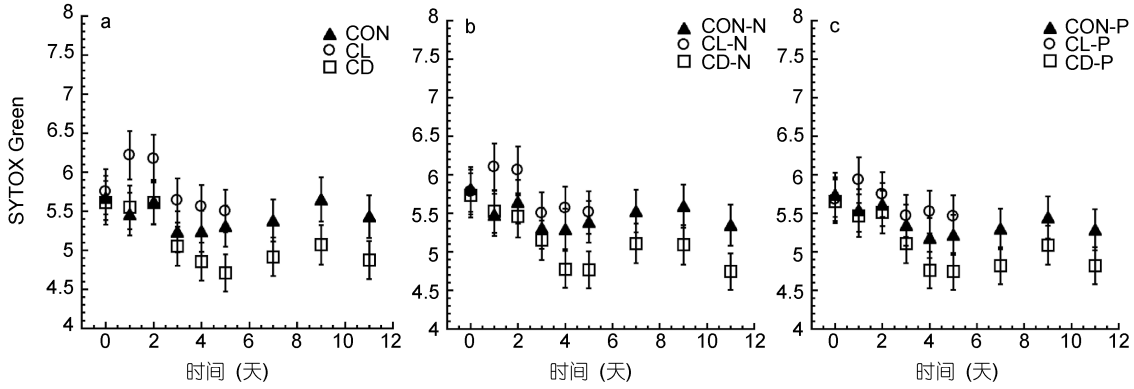


图 4 常温(CON)、低温(CL)和低温黑暗(CD)条件对强壮前沟藻 SYTOX Green 染色(取对数值)的影响

Fig.4 The effect of normal condition (CON), low temperature (CL) and cold dark environment (CD) on the SYTOX Green staining (logarithmic value) of *Amphidinium carterae*

注: a. 营养充足情况下; b. 氮限制情况下; c. 磷限制情况下

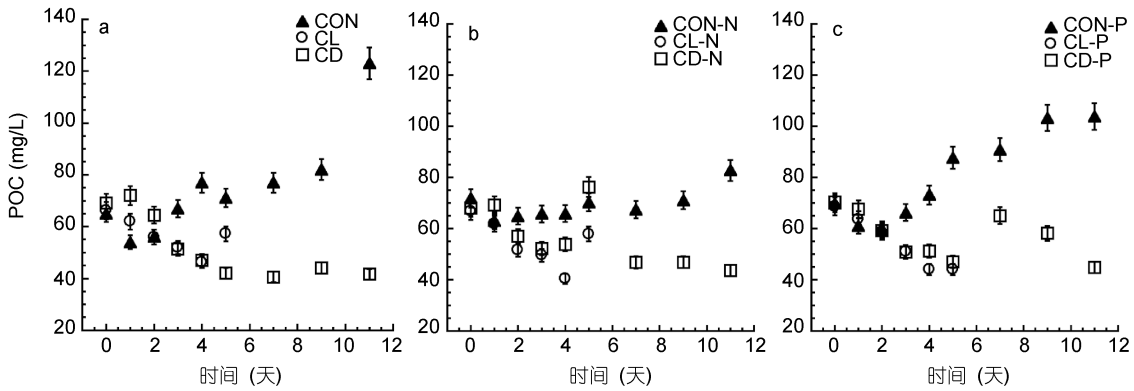


图 5 常温(CON)、低温(CL)和低温黑暗(CD)条件对强壮前沟藻 POC 的影响

Fig.5 The effect of normal condition (CON), low temperature (CL) and cold dark environment (CD) on POC of *Amphidinium carterae*

注: a. 营养充足情况下; b. 氮限制情况下; c. 磷限制情况下

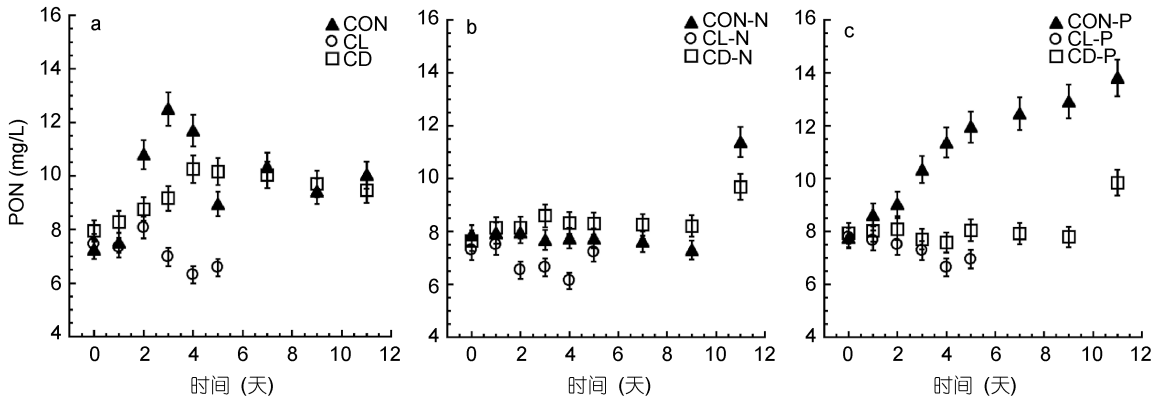


图 6 常温(CON)、低温(CL)和低温黑暗(CD)条件对强壮前沟藻 PON 的影响

Fig.6 The effect of normal condition (CON), low temperature (CL) and cold dark environment (CD) on PON of *Amphidinium carterae*

注: a. 营养充足情况下; b. 氮限制情况下; c. 磷限制情况下

3 讨论

3.1 强壮前沟藻在多重逆境条件下的生长和生理响应
 相对于营养匮乏, 本研究数据显示低温和黑暗

逆境条件会对强壮前沟藻的生长、生理产生更加不利的影响, 且这两种条件在多重逆境下是主导的关键性因素, 其中, 10°C 低温对强壮前沟藻的不利影响最为显著。本研究结果表明, 单独低温逆境下, 强壮前

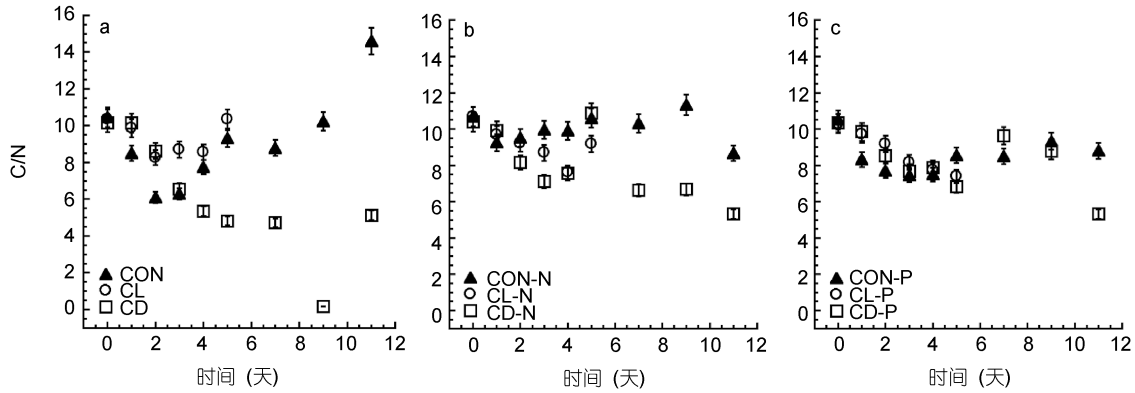


图 7 常温(CON)、低温(CL)和低温黑暗(CD)条件对强壮前沟藻 C/N 比的影响

Fig.7 The effect of normal condition (CON), low temperature (CL) and cold dark environment (CD) on C/N of *Amphidinium carterae*
注: a. 营养充足情况下; b. 氮限制情况下; c. 磷限制情况下

沟藻 SYTOX Green 荧光染色增强,表明藻细胞死亡加剧,同时 F_v/F_m 快速下降,其光合活性迅速降低。其内在原因为低温胁迫可同时作用于藻细胞的基因表达、功能蛋白合成、多糖合成等多个过程,可干扰光合作用并影响细胞的固氮能力,当温度低于藻细胞的耐受温度时,则会引起细胞死亡(贡保东珠, 2011; 王海燕, 2011)。除低温条件外,黑暗作为单独逆境因素也具有致死性,如 Bidle 等(2004)的研究表明,长时间的黑暗能诱发浮游植物的细胞程序性死亡过程。从本研究看,黑暗逆境对强壮前沟藻的 OD_{750} 、chl *a*、 F_v/F_m 、SYTOX Green 染色结果产生了显著性影响($P < 0.001$, 如表 2 所示)。

当黑暗和低温逆境条件耦合时,强壮前沟藻的细胞死亡过程反而得以缓解,其具体表现为在低温黑暗环境中藻细胞 SYTOX Green 染色强度处于较低水平,chl *a* 稳定, F_v/F_m 有所上升。据此,进一步推断藻细胞可能处于一种“休眠”状态,细胞内光合效率大幅度减弱的同时胞内酶活性降低,呼吸作用得到抑制,新陈代谢与物质损耗变慢,从而可以帮助藻细胞保存实力,在营养条件和光照状况好转时快速恢复生长。这一推断在前人的研究中也得到了印证, Monteciaro 等(2006)将此称为微藻生物的内稳态策略(homeostatic responses),即在极端环境下浮游植物会通过降低代谢和抑制生长繁殖来增大存活几率。魏静等(2013)研究发现,低温黑暗环境可暂时抑制南极衣藻(*Chlamydomonas* sp.)细胞的生长,并降低细胞运动速率,同时衣藻细胞的光合作用能力得到保护,POC 含量保持稳定。Peters 等(1996)也发现了黑暗低温环境下四种硅藻的内稳态策略。本次实验的结果显示,强壮前沟藻作为非极地藻亦可借助“内稳态”策略

在低温黑暗环境下提高其生存概率。

营养限制和低温逆境条件耦合会对强壮前沟藻细胞内直接与物质代谢相关的生理生化指标(生物量 OD_{750} 和碳氮比 C/N)产生显著性影响($P < 0.01$, 见表 2),这点与营养限制或低温逆境单独作用下强壮前沟藻的生理生化表现有所不同。单独营养限制下, OD_{750} 和 C/N 也会受到显著性影响($P < 0.05$, 见表 2),但其显著性低于营养限制与低温并存的双重逆境条件。而单独低温条件下,强壮前沟藻的 SYTOX Green 和 F_v/F_m 受影响显著($P < 0.001$, 见表 2)。营养限制与低温逆境同时发生时,彼此产生了耦合效应,其效果不再是两个逆境因素单独作用于强壮前沟藻时生理生化反应的叠加。

3.2 多重逆境条件对强壮前沟藻种群的影响

从种群的角度出发,逆境条件的致死性是相对的。低温、黑暗和营养匮乏等逆境条件可以使单个藻细胞致死,但对细胞群体却不尽然,这与前人的研究结果一致(Berges *et al*, 1998)。从实验结果来看,SYTOX Green 染色增强,由此可知藻细胞作为个体死亡增加,然而多数情况下,存活的少数藻细胞反而可以借助死亡细胞所释放的营养物质和空间优势,在环境转好时快速生长繁殖(Redfield *et al*, 1958; Falkowski *et al*, 1998)。从“红皇后假说”(the red queen hypothesis)的理论出发,细胞死亡可被视为浮游植物种群调控个体数量的一种方式,在群体遭遇逆境环境时,部分细胞的“无私死亡”增大了群体存活概率(Franklin *et al*, 2006)。对于该现象,藻细胞除了因逆境导致“被动”死亡并释放营养物质以供存活细胞利用外,还可能存在一定的“主动”倾向,即其可能借助激素、化学物质等方式通过化感作用调节种间与种内

关系(Hu *et al.*, 2008; Vidoudez *et al.*, 2008; Ianora *et al.*, 2010)。

4 结语

综上所述,从单个浮游植物细胞的层面来看,藻细胞内部的光合作用、新陈代谢、程序性死亡等过程相互影响,彼此关联,在海洋微藻生理生化研究中应给予其更全面的考虑。从赤潮预估的角度来看,虽然氮、磷营养限制确实会对浮游植物的生理代谢、生长繁殖产生影响,如干扰细胞的生物量和有机碳氮比,但从本次实验结果中看,其影响远不及低温和黑暗逆境条件。赤潮发生时,营养盐限制并非浮游植物种群消亡、群落演替的唯一限制性因素,低温和黑暗条件对多个生理生化指标也可产生显著影响。温度变化会导致浮游植物的突发性增殖,影响浮游植物的群落结构与年际变化(Agawin *et al.*, 2000; Zinser *et al.*, 2007),而受天气影响的光照变化会导致短时间内群落结构改变和赤潮发生。根据往年观测,东海春季暴发大规模夜光藻(*Noctiluca scientillans*)、东海原甲藻(*Prorocentrum micans*)赤潮时大多是连日阴雨多云天气,而夏秋季节爆发中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)赤潮时大多以晴天为主(孙霞, 2005)。在海洋环境中,天气变化、洋流运动、气流交锋等时有发生,光照温度条件随之变化,进而影响赤潮的发展动态,对赤潮预测具有重要的参考价值。

致谢 感谢陈道毅老师以及厦门大学藻种库对本次研究的支持。

参 考 文 献

王海燕, 2011. 发状态珠藻对低温胁迫的响应机制研究. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 10—13

孙 霞, 2005. 光照对东海赤潮高发区赤潮藻类生长的影响. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 5—6

贡保东珠, 2011. 低温胁迫下发状态珠藻蛋白质组学的研究. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 3—4

沈萍萍, 王朝晖, 齐雨藻等, 2001. 光密度法测定微藻生物量. 暨南大学学报(自然科学版), 22(3): 115—119

郭匡春, 2007. 浮游动物与藻类水华的控制. 武汉: 中国科学院研究生院(水生生物研究所)博士学位论文, 11—16

韩笑天, 颜 天, 邹景忠等, 2004. 强壮前沟藻(*Amphidinium carterae* Hulbert)形态特征及其生长特性研究. 海洋与湖沼, 35(3): 279—283

冀晓青, 韩笑天, 杨佰娟等, 2012. 强壮前沟藻化感物质分析. 生态学报, 32(6): 1745—1754

魏 静, 王小冬, 2013. 南极衣藻对黑暗和低温的适应与恢复. 中国海洋大学学报, 43(6): 81—86

Agawin N S R, Duarte C M, Agustí S, 2000. Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography*, 45(3): 591—600

Berges J A, Falkowski P G, 1998. Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: Induction of proteases in response to nitrogen or light limitation. *Limnology and Oceanography*, 43(1): 129—135

Bidle K D, Falkowski P G, 2004. Cell death in planktonic, photosynthetic microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8): 643—655

Falkowski P G, Barber R T, Smetacek V, 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 281(5374): 200—206

Franklin D J, Brussaard C P D, Berges J A, 2006. What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology?. *European Journal of Phycology*, 41(1): 1—14

Guillard R R L, Ryther J H, 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2): 229—239

Hu Z Q, Li D H, Xiao B *et al.*, 2008. Microcystin-RR induces physiological stress and cell death in the cyanobacterium *Aphanizomenon* sp. DC01 isolated from Lake Dianchi, China. *Fundamental and Applied Limnology*, 173(2): 111—120

Ianora A, Miralto A, 2010. Toxigenic effects of diatoms on grazers, phytoplankton and other microbes: a review. *Ecotoxicology*, 19(3): 493—511

Jauzein C, Erdner D L, 2013. Stress-related responses in *Alexandrium tamarense* cells exposed to environmental changes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60(5): 526—538

Jiang Y L, Yin K D, Berges J A *et al.*, 2014. Effects of silicate resupply to silicate-deprived *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) in stationary or senescent phase: short-term patterns of growth and cell death. *Journal of Phycology*, 50(3): 602—606

Maxwell R, 1984. Plant pigments. In: Parsons T R, Maita Y eds. *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Oxford, UK: Pergamon Press, 101—105

Montecchiario F, Hirschmugl C J, Raven J A *et al.*, 2006. Homeostasis of cell composition during prolonged darkness. *Plant, Cell and Environment*, 29(12): 2198—2204

Peters E, Thomas D N, 1996. Prolonged darkness and diatom mortality I: marine Antarctic species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 207(1—2): 25—41

Redfield A C, 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, 46(3): 205—221

Sriharan S, Bagga D, Sriharan T P, 1990. Effects of nutrients and temperature on lipid and fatty acid production in the diatom *Hantzshia* DI-60. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24-25: 309—316

Vidoudez C, Pohnert G, 2008. Growth phase-specific release of

polyunsaturated aldehydes by the diatom *Skeletonema marinoi*. *Journal of Plankton Research*, 30(11): 1305—1313
Zinser E R, Johnson Z I, Coe A *et al*, 2007. Influence of light and

temperature on *Prochlorococcus* ecotype distributions in the Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography*, 52(5): 2205—2220

THE GROWTH AND PHYSIOLOGICAL CHANGES OF *AMPHIDIINIUM CARTERAE* HULBERT UNDER ENVIRONMENTAL STRESSES

ZHANG Zhen-Ni^{1,2}, JIANG Yue-Lu^{1,2}, LI Man-Lu^{1,2}, WEI Peng-Ji^{1,2}

(1. *Division of Ocean Science and Technology, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China;*

2. *School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China*)

Abstract Environmental stresses can cause the recession or death of phytoplankton in the natural aquatic environment. Though single environment stress is well documented, the coupled impacts of two or more environmental stresses on the growth and physiological changes of microalgae and the mechanisms still need further study. This study examined OD_{750} , chl *a*, F_v/F_m and C/N of *Amphidinium carterae* Hulbert under nine different environments (normal, cold and cold dark physical conditions, combined with full-nutrient, N-deprived or P-deprived medium) to test the growth, physiological and biochemical changes of algae cells. The study shows that as the single adverse condition, coldness and darkness have more significant effects on the growth, death and physiological changes of *A. carterae* than N-deprived or P-deprived conditions. But when nutrients deprivation and coldness occur together, it will significantly affect the growth and cellular composition of *A. carterae* ($P < 0.01$). Besides, the coupling of coldness and darkness stresses happening together may even alleviate the cell death progress in adverse environment with low SYTOX Green dyeing results, stable chl *a* concentration and slightly growing F_v/F_m .

Key words *Amphidinium carterae*; cold environment; dark environment; N-deprived medium; P-deprived medium; multiple environmental stresses