

文章编号: 1674-5566(2017)04-0546-08

DOI:10.12024/jsou.20160901866

米氏凯伦藻生长对磷的响应及其吸收动力学研究

周 钦^{1,2}, 马增岭¹, 袁兴伟², 沈盎绿²

(1. 温州大学 浙江省水环境与海洋生物资源保护重点实验室, 浙江 温州 325035; 2. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090)

摘 要: 研究了 3 种不同无机磷水平培养条件下对米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*) 细胞密度、体积的影响以及米氏凯伦藻的磷吸收动力学行为。结果表明: 不同无机磷水平培养条件对米氏凯伦藻的生长有显著影响。在整个实验期间, 磷浓度越高, 米氏凯伦藻细胞密度越高, 而且从第 12 天开始到实验结束, 高磷组中米氏凯伦藻细胞密度均显著高于中磷组和低磷组 ($P < 0.05$); 与之相反, 低磷组中米氏凯伦藻细胞体积从第 6 天开始显著大于中磷和高磷组 ($P < 0.05$), 而中磷组中米氏凯伦藻体积与高磷组差异不显著 ($P > 0.05$)。利用米氏方程可较好地拟合米氏凯伦藻对无机磷的吸收速率和初始磷浓度之间关系, 其中米氏凯伦藻对无机磷的最大吸收速率 (ρ_{\max}) 为 18.587 fmol/(cell · h), 半饱和常数 (K_s) 为 0.490 $\mu\text{mol/L}$ 。鉴于东海赤潮高发区的海水中无机磷含量偏低的事实 (0.10 $\mu\text{mol/L}$ 左右), 米氏凯伦藻对无机磷的较强亲和力以及低磷条件下的持续增长潜力表明在低磷条件下甲藻对营养盐的吸收比硅藻更具有竞争力, 从而驱动东海区硅藻赤潮和甲藻赤潮演替。

关键词: 米氏凯伦藻; 无机磷; 生长; 吸收动力学

中图分类号: X 55 **文献标志码:** A

浮游植物生长受到多种生物因子和非生物因子的综合影响, 其中营养盐是赤潮发生的首要物质基础^[1]。在赤潮发生过程中, 当赤潮优势种对某种营养元素需求特别大时反而成为限制因素^[2], 因此, 营养盐的变化能引起海洋浮游植物群落的变动。研究发现, 中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*)、东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 和米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*) 是近年来东海赤潮高发区的主要赤潮生物^[3]。硅藻和甲藻赤潮演替经常交替进行 (硅藻-甲藻-硅藻), 在营养盐特别是磷水平较高时, 硅藻赤潮占据优势, 随后当海水中磷元素消耗至较低水平时, 甲藻赤潮占据优势^[2]。在磷限制的富营养化海域中爆发甲藻赤潮, 很可能跟甲藻的一些特殊环境适应策略有关。

米氏凯伦藻属于甲藻门 (Pyrrophyta), 裸甲藻目 (Gymnodiniales), 凯伦藻属 (*Karenia*)。米氏凯伦藻是一种世界范围内常见的有毒有害赤潮藻^[4], 已在中国、澳大利亚、日本、南美、北非等水域引发过赤潮, 造成了严重的经济损失^[5-8]。目前国内外对米氏凯伦藻的相关研究主要集中在采用分子生物学手段结合形态特征对米氏凯伦藻分类鉴定^[9-12]以及现场监测^[13], 米氏凯伦藻的生物行为 (吞噬营养行为、种间竞争等) 及影响因素对于研究赤潮的发生发展机制^[14-21], 以及米氏凯伦藻产生的毒素成分和毒素效应^[22-24]。另外, 不同营养盐条件对米氏凯伦藻的生长特性也进行了研究^[25-26], 但是, 有关米氏凯伦藻的磷吸收动力学特性研究却不够深入^[27]。针对近年来米氏凯伦藻赤潮在东海经常爆发, 而且鉴于米氏凯

收稿日期: 2016-09-22 修回日期: 2017-02-19

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (2015M06); 国家自然科学基金青年项目 (41506194); 浙江省水环境与海洋生物资源保护重点实验室开放基金 (KF201502); 浙江省自然科学基金 (LY14C030006); 浙江省科技厅公益项目 (2015C33246)

作者简介: 周 钦 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为浮游生物生态学。E-mail: 843525373@163.com

通信作者: 沈盎绿, E-mail: shenanglv@163.com

伦藻赤潮爆发时海水中磷含量偏低的事实,很有必要深入研究不同磷水平下米氏凯伦藻的生长以及磷吸收动力学特性,从而更好地探讨米氏凯伦藻赤潮的爆发机制。

1 材料与方法

1.1 藻种来源与培养条件

米氏凯伦藻由中国水产科学研究院东海水产研究所提供,采用 f/2 培养基培养。培养基所用海水采自浙江省舟山市嵊山岛附近(30°45'N, 122°50'E),海水 pH 为 8.0,盐度为 28,海水经过孔径为 0.45 μm 滤膜过滤后备用。海水和培养基储备液通过 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min,在超净工作台配制所需培养基,所有培养基储备液、藻类培养所需三角瓶等全部经过高压灭菌后使用。藻类培养温度为(20 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$,光照强度为 65~70 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗比为 12 h:12 h,所有实验光照强度和光暗比均为这个条件。藻类培养和实验均在光照培养箱中进行(MTI-201B, Rikakikai, Japan)。所有实验采用的藻类均为培养至指数生长期藻类(根据前期实验,新接种的米氏凯伦藻在培养一周左右即进入指数生长期)。

1.2 不同无机磷浓度培养对米氏凯伦藻生长的影响实验

培养实验中米氏凯伦藻的起始密度均为 2×10^4 cells/mL,培养条件与前面一致。设高(HP)、中(MP)、低(LP)3个不同无机磷(Dissolved inorganic phosphorus, DIP, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 配置)水平组,相对应的无机磷(PO_4^{3-})起始浓度分别为 6.5、1.8 和 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (一次性培养,中间不添加营养盐)。其他营养元素浓度为 f/2 培养基配方浓度。培养容器为 250 mL 三角瓶(其中实验用藻液 200 mL),每个浓度组重复 3 次,每天早晚固定时间手动摇动藻液 2 次,分别在第 0、6、12、18、24、30、36、42、48 和 54 天取样用鲁戈氏液固定,在光学显微镜(BX43, Olympus, Japan)下采用浮游植物计数框计数,并取样后在显微镜下测量米氏凯伦藻体长、体宽和相关指标,根据 SUN 和 LIU^[28]方法计算米氏凯伦藻细胞体积。同时同步测定溶液中无机磷含量,测定方法参照海洋监测规范^[29]。

藻类比生长速率(μ , / d)计算按照公式

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

式中: N_1 为培养时间为 t_1 时藻类细胞浓度; N_2 为培养时间为 t_2 时藻类细胞浓度。

藻细胞体积计算按照公式

$$V = (\pi/6) \cdot b^2 \cdot a \quad (2)$$

式中: V 为藻细胞体积; a 为藻细胞长(μm); b 为藻细胞宽(μm)。

1.3 磷吸收动力学实验设计

实验前将藻细胞离心收集,根据 TOVAR-SANCHEZ 等^[30]的方法利用细胞表面离子清除剂清洗藻类细胞表面的 PO_4^{3-} ,重复洗涤、离心 2 次后转入无磷培养基中,磷饥饿培养 7 d 以消耗细胞体内磷库,然后即可作为磷吸收动力学实验藻种。将藻种接入不同磷浓度(0.30、1.13、2.25、4.50 和 9.00 $\mu\text{mol}/\text{L}$)的培养基中,细胞密度为 1.5×10^4 cells/mL,每个浓度设 3 个平行,分别在接种 24 h 后取样,同时用滤膜过滤后测定培养基中无机磷的浓度。

磷吸收动力学模型主要参照 Michaelis-Menten 方程^[31-32]:

$$\rho = \rho_{\max} \times S / (K_s + S) \quad (3)$$

式中: S 为基质中无机磷浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$); K_s 为无机磷半饱和吸收常数($\mu\text{mol}/\text{L}$); ρ 为无机磷吸收速率[fmol/(cell \cdot h)]; ρ_{\max} 为无机磷最大吸收速率[fmol/(cell \cdot h)],营养吸收动力学参数采用非线性最小平方估算。

1.4 数据处理

利用均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)描述实验数据的数字特征。3种无机磷水平之间的生长(细胞密度、体积、体长和体宽)差异采用独立样本 t 检验。上述检验的显著性水平设定为 0.05。数据处理采用的软件为 PASW Statistics 18.0 和 Excel 2010。

2 结果

2.1 不同无机磷水平对米氏凯伦藻生长的影响

由图 1 可知,不同无机磷浓度培养对米氏凯伦藻生长的影响显著($P < 0.05$)。从第 12 天开始到实验结束,高磷组中米氏凯伦藻细胞密度均显著高于中磷组和低磷组($P < 0.05$)。实验中低磷组米氏凯伦藻细胞密度始终处于一个较低的水平($< 5.0 \times 10^4$ cells/mL),且波动变化较小。中磷浓度组细胞密度 18 天之前细胞浓度增加幅

度较快,在 18 天之后进入相对稳定期,变化幅度较小,细胞密度维持在 10.0×10^4 cells/mL 之上。高磷组米氏凯伦藻经过短暂的过渡期,从第 6 天开始进入对数期迅速增长,其增加幅度较中磷浓度组 and 低磷组明显,细胞密度在 42 天到达最高值(58.8×10^4 cells/mL)。

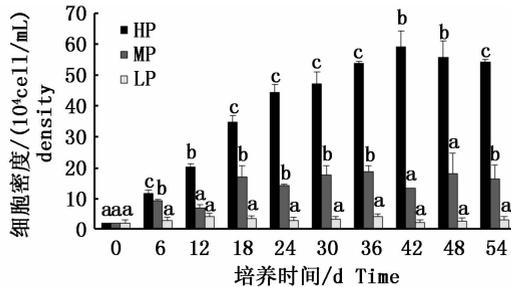


图 1 不同无机磷水平培养下米氏凯伦藻细胞浓度的变化趋势

Fig. 1 Variation in cell densities of *K. mikimotoi* at the different phosphorus levels during the batch culture

3 个处理间字母不相同表示差异显著, $P < 0.05$, 图 2 和 3 同 Means superscripted with different letters are significantly different ($P < 0.05$) from each other, the same in Fig. 2 and 3

由图 2 可知,不同无机磷水平培养条件下米氏凯伦藻生长速率差异非常明显 ($P < 0.05$),在低磷培养条件下,在实验开始阶段时比生长速率处于较低水平,之后比生长速率是有正有负,生长处于小幅波动状态。在中磷培养条件下,在前 6 天米氏凯伦藻生长较快 ($0.253 / d$),之后比生长速率是有正有负。在高磷培养条件下,在前阶段比生长速率处于较高水平,而后有所下降,后期比生长速率也处于负值状态。

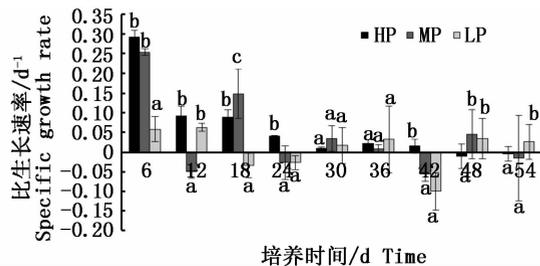


图 2 不同磷水平培养下米氏凯伦藻比生长速率的变化趋势

Fig. 2 Variation in specific growth rates of *K. mikimotoi* at the different phosphorus levels during the batch culture

2.2 不同无机磷水平对米氏凯伦藻细胞体积的影响

由图 3 可知,不同无机磷水平培养对米氏凯伦藻细胞体积的影响显著 ($P < 0.05$)。低磷组米氏凯伦藻细胞体积从第 6 天开始到实验结束均显著高于中磷和高磷组 ($P < 0.05$)。中磷和高磷组米氏凯伦藻细胞体积会随着培养时间的增加而逐渐增大,但增加幅度较小,中磷组中米氏凯伦藻细胞体积比高磷组大,但是相差不显著 ($P > 0.05$)。从表 1 可知,不同无机磷水平培养对米氏凯伦藻细胞体长和体宽的影响显著 ($P < 0.05$)。低磷组米氏凯伦藻细胞体长和体宽从第 6 天开始到实验结束均显著高于中磷和高磷组 ($P < 0.05$),而中磷组和高磷组米氏凯伦藻细胞体长和体宽在整个实验周期相差不明显 ($P > 0.05$, 第 42 天除外)。

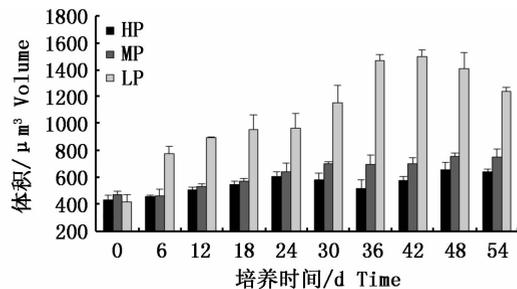


图 3 不同无机磷水平培养下米氏凯伦藻细胞体积的变化趋势

Fig. 3 Variation in cell volumes of *K. mikimotoi* at the different phosphorus levels during the batch culture

另外,根据同步测定水体中无机磷含量发现,在培养初期(6 ~ 12 d),各实验组水体中无机磷含量均快速下降,其中低磷组水体中无机磷的含量基本上就维持在 $0.10 \mu\text{mol/L}$ 以下直至实验结束,中磷组水体中无机磷的含量基本上就维持在 $0.10 \sim 0.20 \mu\text{mol/L}$ 之间直至实验结束,而高磷组水体中无机磷的含量在第 12 天降至 $0.20 \mu\text{mol/L}$ 以下,而后水体中无机磷含量有小幅波动,至实验结束时无机磷含量为 $0.27 \mu\text{mol/L}$ 。结合表 1、图 3-4,当水体中无机磷含量低于 $0.10 \mu\text{mol/L}$ 时米氏凯伦藻细胞体积、体长、体宽等明显大于无机磷含量较高水体中的米氏凯伦藻。

表 1 不同无机磷水平培养下米氏凯伦藻细胞体长和体宽的变化

Tab.1 Variation in length and width of *K. mikimotoi* at the different phosphorus levels during the batch culture

培养时间/d Time	体长/ μm Length			体宽/ μm Width		
	低磷组 Low-phosphorous group	中磷组 Medium-phosphorous group	高磷组 High-phosphorous group	低磷组 Low-phosphorous group	中磷组 Medium-phosphorous group	高磷组 High-phosphorous group
0	10.92 \pm 0.40 ^a	11.26 \pm 0.24 ^a	10.98 \pm 0.01 ^a	8.32 \pm 0.34 ^a	8.80 \pm 0.15 ^a	8.56 \pm 0.31 ^a
6	13.22 \pm 0.31 ^b	11.01 \pm 0.45 ^a	11.23 \pm 0.16 ^a	10.37 \pm 0.23 ^b	8.76 \pm 0.24 ^a	8.72 \pm 0.08 ^a
12	13.90 \pm 0.12 ^b	11.57 \pm 0.11 ^a	11.83 \pm 0.07 ^a	10.84 \pm 0.08 ^b	9.25 \pm 0.07 ^a	8.94 \pm 0.14 ^a
18	13.93 \pm 0.36 ^b	11.81 \pm 0.08 ^a	11.79 \pm 0.28 ^a	11.21 \pm 0.44 ^b	9.45 \pm 0.17 ^a	9.29 \pm 0.10 ^a
24	14.00 \pm 0.43 ^b	12.00 \pm 0.12 ^a	11.89 \pm 0.26 ^a	11.19 \pm 0.50 ^b	9.88 \pm 0.32 ^a	9.69 \pm 0.24 ^a
30	14.46 \pm 0.84 ^b	12.21 \pm 0.09 ^a	11.71 \pm 0.39 ^a	12.07 \pm 0.39 ^b	10.24 \pm 0.09 ^a	9.61 \pm 0.27 ^a
36	15.44 \pm 0.19 ^b	12.10 \pm 0.54 ^a	11.33 \pm 0.39 ^a	13.22 \pm 0.10 ^b	10.27 \pm 0.31 ^a	9.12 \pm 0.40 ^a
42	15.57 \pm 0.01 ^c	12.19 \pm 0.19 ^b	11.40 \pm 0.23 ^a	13.35 \pm 0.19 ^b	10.31 \pm 0.18 ^a	9.65 \pm 0.22 ^a
48	15.03 \pm 0.49 ^b	12.47 \pm 0.04 ^a	11.88 \pm 0.29 ^a	13.04 \pm 0.30 ^b	10.48 \pm 0.15 ^a	10.09 \pm 0.31 ^a
54	14.62 \pm 0.27 ^b	12.25 \pm 0.47 ^a	11.75 \pm 0.24 ^a	12.45 \pm 0.22 ^b	10.54 \pm 0.14 ^a	10.02 \pm 0.08 ^a

注:表中同一行(体长/体宽)数据不同上标字母代表有显著差异($P < 0.05$)

Note: The different superscripts of the same row (Length/Width) values are significantly different ($P < 0.05$) from each other

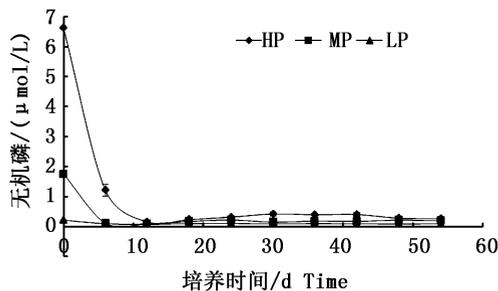


图 4 不同无机磷水平培养下基质中无机磷的变化趋势

Fig. 4 Variation in DIP of the media at the different phosphorus levels during the batch culture

2.3 米氏凯伦藻细胞磷吸收动力学特征

由图 5 可见,随着水体无机磷浓度提高,米氏凯伦藻对无机磷的吸收速率不断增大。作磷吸收速率 ρ 对无机磷浓度 S 得双倒数曲线,由此求得最大吸收速率 ρ_{\max} 为 18.587 $\text{fmol}/(\text{cell} \cdot \text{h})$,半饱和常数 K_s 为 0.490 $\mu\text{mol}/\text{L}$,米氏凯伦藻吸收无机磷的动力学过程可用米氏方程来描述,回归方程为 $\rho = 18.587 S / (0.490 + S)$ 。线性回归分析表明,双倒数曲线的决定系数 $R^2 = 0.8577$,其线性拟合在 $P = 0.01$ 水平上显著。

3 讨论

磷在水环境中的时空分布对海洋生态系统中的初级生产过程有着决定性作用,同时对赤潮的形成和消亡也具有非常关键的作用^[33]。米氏凯伦藻近年来成为东海赤潮高发区的主要有毒有害优势种,海区磷水平的变化与米氏凯伦藻生

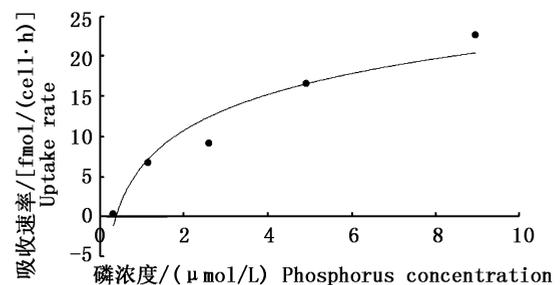


图 5 米氏凯伦藻的无机磷吸收动力学曲线

Fig. 5 Kinetics curves of inorganic phosphorus uptake in *K. mikimotoi* during the batch culture

长之间的相关性研究变得尤为重要。在本实验中,高磷和中磷组中米氏凯伦藻在实验前期(第 6 天)藻类生长均呈指数生长,比生长速率 μ 分别为 0.292 /d 和 0.254 /d,而低磷组中米氏凯伦藻细胞密度虽然也有所增加,但是比生长速率 μ 只有 0.058 /d(图 2),米氏凯伦藻最高细胞密度随着磷水平的增加而增加,高磷组中米氏凯伦藻最高细胞密度能达到 $58.8 \times 10^4 \text{ cells}/\text{mL}$,中磷组则在 $15.0 \sim 20.0 \times 10^4 \text{ cells}/\text{mL}$ 之间波动,而低磷组则在 $5.0 \times 10^4 \text{ cells}/\text{mL}$ 之下(图 1),由此可见,低磷水平对米氏凯伦藻的生长已经产生了一定的限制作用。曹春晖等^[25]在研究不同氮磷对米氏凯伦藻生长的影响时发现在适当的磷水平培养下,米氏凯伦藻比生长速率随着磷水平(0.046 ~ 1.850 mmol/L)的增加而增加,在磷酸盐浓度为 0.230 mmol/L 时达到峰值(0.568 /d),而后有所下降,而塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)则在磷酸盐浓度为 0.036 mmol/L 条件下具有最

大的比生长速率(0.50/d)^[34],对于微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)而言,不同磷水平(0.003 6、0.036和0.108 mmol/L)培养下藻类比生长速率相差不大(0.42~0.45/d),但是高磷组藻类细胞密度最高^[35],在中肋骨条藻对磷的需求则更明显,在无磷或者低磷条件下其生长速率明显低于高磷条件^[23]。后期研究可以对米氏凯伦藻、东海原甲藻和中肋骨条藻等^[36]东海区常见赤潮生物在磷浓度设置一致的情况下进行对比生长实验,从而进一步来探讨磷在硅甲藻生长周期中的作用。另外,本课题组在前期研究发现,低磷培养条件下米氏凯伦藻细胞体积会增大,添加磷元素后细胞体积又恢复正常,而东海原甲藻则无论在低磷还是添加磷元素之后其细胞体积变化不明显^[26]。本研究在之前基础上设置不同磷水平,探讨到底海水中磷浓度处于何种水平时,米氏凯伦藻细胞体积会显著增大,结果表明,当海水中无机磷含量低于0.10 μmol/L时米氏凯伦藻细胞体积等明显大于无机磷含量较高水体中的米氏凯伦藻($P < 0.05$)。这是某些甲藻藻类遇到不良环境时的一种应激反应,当水体中磷缺乏时,藻类可以利用细胞内营养盐库的调节来缓解,甲藻具有较高的营养盐储存能力,当环境恢复到原先状态时藻类体积也恢复正常,类似的情况也出现在链状裸甲藻(*Gymnodinium catenatum*)中^[37]。在东海区甲藻赤潮爆发高峰期(5月),海水中磷酸盐含量就相当低,绝大部分时间无机磷含量均低于0.10 μmol/L^[38]。因此,在赤潮现场采集的米氏凯伦藻细胞体积明显大于实验室正常营养盐培养下的米氏凯伦藻细胞^[39]。

营养盐吸收动力学参数 ρ_{\max} 和 K_s 是目前最常用表达浮游植物对营养盐亲和力的参数, ρ_{\max} 升高或是 K_s 降低均有利于浮游植物竞争营养盐^[40-41]。一般来说,当水体中营养盐丰富时,具有较高 ρ_{\max} 的藻类能够迅速吸收营养盐储存于体内从而形成营养库^[42]。对于海洋中常见的硅藻和甲藻而言,其无机磷吸收动力学特征有所不同,东海区常见赤潮生物旋链角毛藻(*Chaetoceros curvisetus*)对无机磷的最大吸收速率 ρ_{\max} 为20.59 fmol/(cell·h),半饱和常数 K_s 为0.90 μmol/L,而玛氏骨条藻(*S. marinoi*)对无机磷的最大吸收速率 ρ_{\max} 为24.03 fmol/(cell·h),半饱和常数 K_s 为2.02 μmol/L^[42];另外一种常见赤潮生物尖刺

拟菱形藻(*Pseudonitzschia pungens*)则具有更高的 ρ_{\max} [148 fmol/(cell·h)]和 K_s (1.40 μmol/L)^[43],中华盒形藻(*Biddulphia sinensis*)对无机磷的最大吸收速率 ρ_{\max} 更是比尖刺拟菱形藻高出10倍[$\rho_{\max} = 1497$ fmol/(cell·h)],半饱和常数 K_s 也达到2.398 μmol/L^[44]。甲藻链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)对无机磷最大吸收速率 ρ_{\max} 为230 fmol/(cell·h),半饱和常数 K_s 为0.920 μmol/L^[45],李英等^[46]研究了东海原甲藻对无机磷(磷酸盐)吸收动力学特征,结果得出半饱和常数 K_s 为0.060 μmol/L,赵晓玮^[34]得出东海区米氏凯伦藻对磷的半饱和常数 K_s 为0.199 μmol/L。在本实验中发现,米氏凯伦藻的 ρ_{\max} 为18.587 fmol/(cell·h), K_s 值为0.490 μmol/L,虽然与赵晓玮^[28]的实验结果有一定差异,可能是由于米氏凯伦藻不同株系造成的(前者米氏凯伦藻来自中国海洋大学藻种库,本实验米氏凯伦藻从东海区赤潮高发区分离而得),但 K_s 都是低于0.5 μmol/L。总之,甲藻对无机磷吸收的半饱和常数值(< 1.0 μmol/L)比硅藻(> 1.0 μmol/L)要低,对无机磷的亲和力更强。当海区无机磷比较丰富的时候,由于硅藻对无机磷具有更高的最大吸收速率[> 20 fmol/(cell·h)],硅藻生长速度很快,容易形成赤潮(东海区在4月海区营养盐丰富,磷酸盐含量达到0.40 μmol/L^[26]),硅藻赤潮高峰过后磷酸盐含量迅速下降(东海区在5月份的磷酸盐含量降至0.09 μmol/L^[26]),此时,由于甲藻比硅藻对无机磷具有更高的亲和力,所以其仍能正常生长,从而形成甲藻赤潮(比如东海原甲藻、米氏凯伦藻等甲藻赤潮)。

米氏凯伦藻作为近年来东海区常见有毒有害赤潮藻,对海洋生态和水产养殖业均会产生不良影响,磷元素作为海区营养盐的重要限制性因素,因此,非常有必要对米氏凯伦藻在不同磷营养条件下的生理生化响应进行深入研究。

参考文献:

- [1] PAERL H W. Coastal eutrophication and harmful algal blooms: Importance of atmospheric deposition and groundwater as "new" nitrogen and other nutrient sources [J]. *Limnology and Oceanography*, 1997, 42(5 part 2): 1154-1165.
- [2] 赵冬至. 中国典型海域赤潮灾害发生规律[M]. 北京: 海洋出版社, 2010.
ZHAO D Z. Occurrence regularity of marine red tide disaster

- in typical areas in China[M]. Beijing: Marine Press, 2010.
- [3] 刘录三, 李子成, 周娟, 等. 长江口及其邻近海域赤潮时空分布研究[J]. 环境科学, 2011, 32(9): 2497-2504.
LIU L S, LI Z C, ZHOU J, et al. Temporal and spatial distribution of red tide in Yangtze River estuary and adjacent waters[J]. Environmental Science, 2011, 32(9): 2497-2504.
- [4] 张勇, 杨维东, 李宏业, 等. 米氏凯伦藻对蒙古裸腹蚤的毒性及致毒途径分析[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(1): 94-98.
ZHANG Y, YANG W D, LI H Y, et al. Toxicity analysis of *Karenia mikimotoi* to *Moina mongolica*[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2011, 6(1): 94-98.
- [5] 王朝晖, 尹伊伟, 齐雨藻, 等. 珠海桂山岛米氏裸甲藻赤潮对鱼鳃损伤的病理学组织观察[J]. 海洋学报, 2001, 23(1): 133-138.
WANG Z H, YI Y W, QI Y Z, et al. Histopathological changes in fish gills during *Gymnodinium mikimotoi* red tide in Guishan Island area, the South China Sea[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2001, 23(1): 133-138.
- [6] YANG Z B, HODGKISS I J. Hong Kong's worst "red tide"—causative factors reflected in a phytoplankton study at Port Shelter station in 1998[J]. Harmful Algae, 2004, 3(2): 149-161.
- [7] SELLEM F, PESANDO D, BODENNEC G, et al. Toxic effects of *Gymnodinium cf. mikimotoi* unsaturated fatty acids to gametes and embryos of the sea urchin *Paracentrotus Lividus*[J]. Water Research, 2000, 34(2): 550-556.
- [8] MITCHELL S, RODGER H. Pathology of wild and cultured fish affected by a *Karenia mikimotoi* bloom in Ireland, 2005 [J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 2007, 27(1): 39-42.
- [9] HANSEN G, DAUGBJERG N, HENRIKSEN P. Comparative study of *Gymnodinium mikimotoi* and *Gymnodinium aureolum*, Comb. Nov. (= *Gyrodinium aureolum*) based on morphology, pigment composition, and molecular data[J]. Journal of Phycology, 2000, 36(2): 394-410.
- [10] 郑俊斌, 张凤英, 马凌波, 等. 米氏凯伦藻 18S rDNA 和转录间隔区序列分析[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(6): 680-685.
ZHENG J B, ZHANG F Y, MA L B, et al. Sequence analysis of *Karenia mikimotoi* based on ribosomal 18S rDNA and internal transcribed space regions [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2009, 18(6): 680-685.
- [11] 郑俊斌, 张凤英, 马凌波, 等. 两种常见外来入侵赤潮藻的 PCR 鉴定[J]. 海洋渔业, 2009, 31(3): 325-329.
ZHENG J B, ZHANG F Y, MA L B, et al. PCR identification of two alien invasive species of red tide algae [J]. Marine Fisheries, 2009, 31(3): 325-329.
- [12] 张凤英, 徐兆礼, 马凌波, 等. 环介导恒温扩增技术快速检测米氏凯伦藻方法的建立[J]. 海洋学报, 2009, 31(6): 170-175.
ZHANG F Y, XU Z L, MA L B, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) establishment for detection of *Karenia mikimotoi* \geq (Dinophyceae) [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2009, 31(6): 170-175.
- [13] 边梅, 郑森林, 刘文华, 等. 应用实时荧光定量 PCR 技术研究九龙江口水域米氏凯伦藻的分布[J]. 台湾海峡, 2012, 31(1): 65-71.
BIAN M, ZHENG S L, LIU W H, et al. Application of real-time PCR for detection of *Karenia mikimotoi* \geq in Jiulongjiang estuary waters[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2012, 31(1): 65-71.
- [14] STOECKER D, TILLMANN U, GRANÉLI E. Phagotrophy in harmful algae[M]//GRAN LI E, TURNER J T. Ecology of Harmful Algae. Berlin Heidelberg: Springer, 2006, 189: 177-187.
- [15] BURKHOLDER J M, GLIBERT P M, SKELTON H M. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters [J]. Harmful Algae, 2008, 8(1): 77-93.
- [16] SMAYDA T J, REYNOLDS C S. Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly [J]. Journal of Sea Research, 2003, 49(2): 95-106.
- [17] UCHIDA T, TODA S, MATSUYAMA Y, et al. Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1999, 241(2): 285-299.
- [18] 周成旭, 傅永静, 严小军. 4 种典型有害赤潮原因种的溶血特性研究[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(1): 78-82.
ZHOU C X, FU Y J, YAN X J. Hemolytic activity studies of several harmful alga strains [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2007, 2(1): 78-82.
- [19] 赵晓玮, 唐学玺, 王悠. 两种海洋赤潮微藻赤潮异弯藻和米氏凯伦藻之间的相互作用[J]. 植物生态学报, 2009, 33(5): 958-965.
ZHAO X W, TANG X X, WANG Y. Interactions between two species of marine bloom microalgae under controlled laboratory conditions: *Heterosigma akashiwo* and *Karenia mikimotoi*[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2009, 33(5): 958-965.
- [20] SHEN A L, YUAN X W, LIU G P, et al. Growth interactions between the bloom-forming dinoflagellates *Prorocentrum donghaiense* and *Karenia mikimotoi* under different temperature[J]. Thalassas, 2014, 30(2): 33-45.
- [21] SHEN A L, XING X L, LI D J. Allelopathic effects of *Prorocentrum donghaiense* and *Karenia mikimotoi* on each other under different temperature[J]. Thalassas, 2015, 31(1): 33-49.
- [22] 崔伟民, 杨维东, 刘洁生, 等. 米氏凯伦藻溶血毒素的溶血反应特征[J]. 热带亚热带植物学报, 2009, 17(3): 237-241.
CUI W M, YANG W D, LIU J S, et al. Hemolytic properties

- of hemolytic extracts from *Karenia mikimotoi* Hasen [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2009, 17(3): 237-241.
- [23] SATAKE M, SHOJI M, OSHIMA Y, et al. Gymnocin-A, a cytotoxic polyether from the notorious red tide dinoflagellate, *Gymnodinium mikimotoi* [J]. Tetrahedron Letters, 2002, 43(33): 5829-5832.
- [24] SATAKE M, TANAKA Y, ISHIKURA Y, et al. Gymnocin-B with the largest contiguous polyether rings from the red tide dinoflagellate, *Karenia* (Formerly *Gymnodinium*) *mikimotoi* [J]. Tetrahedron Letters, 2005, 46(20): 3537-3540.
- [25] 曹春晖, 刘文岭, 施定基, 等. 不同氮磷浓度对米氏凯伦藻生长的影响[J]. 天津科技大学学报, 2010, 25(2): 22-25.
- CAO C H, LIU W L, SHI D J, et al. Effects of nitrate and phosphate concentration on the growth of red tide species *Karenia mikimotoi* [J]. Journal of Tianjing University of Science & Technology, 2010, 25(2): 22-25.
- [26] 沈鑫绿, 李道季. 不同营养盐水平对东海原甲藻和米氏凯伦藻生长的影响[J]. 海洋渔业, 2016, 38(4): 415-423.
- SHEN A L, LI D J. Effects of different nutrients levels on the growth of *Prorocentrum donghaiense* and *Karenia mikimotoi* [J]. Marine Fisheries, 2016, 38(4): 415-423.
- [27] 赵晓玮. 环境中不同氮磷营养盐浓度及氮源形态对米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)生长的影响研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- ZHAO X W. Effects of the variously ambient nitrogen, phosphorus concentrations and nitrogen sources on growth of *Karenia mikimotoi* under laboratory conditions[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010.
- [28] SUN J, LIU D Y. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton[J]. Journal of Plankton Research, 2003, 25(11): 1331-1346.
- [29] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB 17378.4-2007 海洋监测规范 第4部分: 海水分析[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB 17378.4-2007 The specification for marine monitoring—Part 4: Seawater analysis [S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [30] TOVAR-SANCHEZ A, SA UDO-WILHELMY S, GARCIA-VARGAS M, et al. A trace metal clean reagent to remove surface-bound iron from marine phytoplankton [J]. Marine Chemistry, 2003, 82(1/2): 91-99.
- [31] HARRISON P J, PARSLAW J S, CONWAY H L. Determination of nutrient uptake kinetic parameters: a comparison of methods[J]. Marine Ecology Progress Series, 1989, 52: 301-312.
- [32] AKSNES D L, EGGE J K. A theoretical model for nutrient uptake in phytoplankton [J]. Marine Ecology Progress Series, 1991, 70: 65-72.
- [33] 李雁宾. 长江口及邻近海域季节性赤潮生消过程控制机理研究——浮游植物竞争生长三维生态动力学模型的建立与应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- LI Y B. The Study of the seasonal occurrence mechanism of HABs in the Changjiang estuary and its Adjacent Sea [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.
- [34] 石岩峻, 胡晗华, 马润宇, 等. 塔玛亚历山大藻对氮和磷的吸收及其生长特性[J]. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1143-1146.
- SHI Y J, HU H H, MA R Y, et al. Nitrogen and phosphorus absorption and growth characteristics of *Alexandrium tamarense* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(7): 1143-1146.
- [35] 石岩峻, 胡晗华, 马润宇, 等. 不同氮磷水平下微小原甲藻对营养盐的吸收及光合特性[J]. 过程工程学报, 2004, 4(6): 554-560.
- SHI Y J, HU H H, MA R Y, et al. Photosynthetic characteristics of *Prorocentrum minimum* and its nutrient uptake at different nitrogen and phosphorus levels [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2004, 4(6): 554-560.
- [36] 王金塔, 唐洪杰, 杨茹君, 等. 氮磷营养盐对中肋骨条藻生长及硝酸还原酶活性的影响[J]. 海洋科学, 2008, 32(12): 64-68.
- WANG J H, TANG H J, YANG R J, et al. The effects of nitrate and phosphate on the growth and nitrate reductase activity of *Skeletonema costatum* [J]. Marine Sciences, 2008, 32(12): 64-68.
- [37] FLYNN K J, FYNN K, JOHN E H, et al. Changes in toxins, intracellular and dissolved free amino acids of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in response to changes in inorganic nutrients and salinity [J]. Journal of Plankton Research, 1996, 18(11): 2093-2111.
- [38] 张璇, 石晓勇, 张传松, 等. 长江口及邻近海域赤潮藻种演替过程中营养盐特征[J]. 海洋环境科学, 2012, 31(6): 817-820.
- ZHANG X, SHI X Y, ZHANG C S, et al. Nutrient characteristics in red-tide algal succession in Changjiang Estuary and adjacent sea areas [J]. Marine Environmental Science, 2012, 31(6): 817-820.
- [39] 郭皓. 中国近海赤潮生物图谱[M]. 北京: 海洋出版社, 2004.
- GU H. Illustrations of Planktons Responsible for the Blooms in Chinese Coastal Waters [M]. Beijing: China Ocean Press, 2004.
- [40] BUTTON D K. Biochemical basis for whole-cell uptake kinetics: specific affinity, oligotrophic capacity, and the meaning of the Michaelis constant [J]. Apple and Environmental Microbiology, 1991, 57(7): 2033-2038.
- [41] ZOU L, ZHANG J, PAN W X, et al. In situ nutrient

- enrichment experiment in the Bohai and Yellow Sea [J]. *Journal of Plankton Research*, 2001, 23(10): 1111-1119.
- [42] 王丹, 黄春秀, 黄邦钦, 等. 黄海两种典型硅藻的磷胁迫生理研究[J]. *海洋科学*, 2008, 32(5): 22-27.
- WANG D, HUANG C X, HUANG B Q, et al. Physiological responses of two typical species of diatoms to phosphorus stress in Yellow Sea [J]. *Marine Sciences*, 2008, 32(5): 22-27.
- [43] 张诚, 邹景忠. 尖刺拟菱形藻氮磷吸收动力学以及氮磷限制下的增殖特征[J]. *海洋与湖沼*, 1997, 28(6): 599-603.
- ZHANG C, ZOU J Z. Nutrient uptake kinetics and growth under nutrient limitation of *Pseudonitzschia* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1997, 28(6): 599-603.
- [44] 朱小明, 沈国英, 林均民. 中华盒形藻对可溶性活性磷吸收动力学的研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1993, 32(2): 230-235.
- ZHU X M, SHEN G Y, LIN J M. Studies on uptake kinetics of soluble reactive phosphorus by *Biddulphia sinensis* Greville [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 1993, 32(2): 230-235.
- [45] 李天深, 于仁成, 周名江. 链状亚历山大藻(东海株)对磷营养物质的需求与吸收策略[J]. *海洋环境科学*, 2009, 28(4): 355-359.
- LI T S, YU R C, ZHOU M J. Demand and adsorption strategies of phosphorus of *Alexandrium catenella* isolated from East China Sea [J]. *Marine Environmental Science*, 2009, 28(4): 355-359.
- [46] 李英, 吕颂辉, 徐宁, 等. 东海原甲藻对不同磷源的利用特征[J]. *生态科学*, 2005, 24(4): 314-317, 321.
- LI Y, LÜ S H, XU N, et al. The utilization of *Prorocentrum donghaiense* to four different types of phosphorus [J]. *Ecologic Science*, 2005, 24(4): 314-317, 321.

Studies on growth and phosphorous uptake kinetics of *Karenia mikimotoi* at the different phosphorous levels

ZHOU Qin^{1,2}, MA Zengling¹, YUAN Xingwei², SHEN Anglü²

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Subtropical Water Environment and Marine Biological Resources Protection, Wenzhou University, Wenzhou 325035, Zhejiang, China; 2. Key Laboratory of East China Sea & Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Shanghai 200090, China)

Abstract: We conducted a series of conditional experiments to explore the changes in cell densities, volume and phosphorous uptake kinetics of *Karenia mikimotoi* at three different inorganic phosphorus levels. The results showed that the growth of *K. mikimotoi* was significantly affected by inorganic phosphorus levels, the cell densities in high-phosphorous (HP) group were significantly ($P < 0.05$) higher than those in medium-phosphorous (MP) and low-phosphorous (LP) groups starting from the 12th day until to the end of experiment. On the contrary, the cell volume of *K. mikimotoi* which grew in LP group was significantly ($P < 0.05$) greater than those in MP and HP groups from the 6th day, however, it was non-significantly different between MP and HP group ($P > 0.05$). The relationship between inorganic phosphorus absorption rate and initial phosphorus concentration was preferably fitted by the Michaelis-Menten equation. According the equation, the maximum inorganic phosphorus absorption rate of *K. mikimotoi* (ρ_{\max}) was 18.587 fmol/(cell · h) and the half-saturation constant (K_s) was 0.490 $\mu\text{mol/L}$. Given the fact that inorganic phosphorus content was low (approximately 0.10 $\mu\text{mol/L}$) in the East China Sea when dinoflagellates red tides occurred, and *K. mikimotoi* have strong affinity for inorganic phosphorus and continuous growth potential in low phosphorus condition indicate that dinoflagellates have more competitive nutrient absorption ability than diatom, which may promote the succession of the diatom and dinoflagellates red tides in the East China Sea.

Key words: *Karenia mikimotoi*; inorganic phosphorus; growth; uptake kinetics