

高氮磷比与酸化共同作用对微小亚历山大藻生长和产毒的影响

郝爽^{1,2}, 刘丽君¹, 陈军辉², 何秀平², 连子如¹

(1. 山东大学 海洋学院, 山东 威海 264209; 2. 自然资源部第一海洋研究所, 自然资源部海洋生态环境科学与技术重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘要: 通过实验室构建不同氮磷比条件下的酸化海水环境, 培养麻痹性贝毒(paralytic shellfish toxin, PST)产毒藻微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*), 采用藻细胞计数法、分光光度法、高效液相色谱-质谱法等分析方法, 探讨了不同氮磷比条件下的酸化海水对微小亚历山大藻的生长、氮磷营养盐吸收、产毒等参数的影响。结果表明, 在一定程度上, 酸化环境对 *A. minutum* 的生长、PST 的胞内累积和胞外释放有促进作用, 且胞外培养液中 PST 含量增加的程度更高; 同时, 酸化海水促进胞内毒性较低的 N-H 类膝沟藻毒素(GTX2 和 GTX3)被氧化成毒性较高的 N-OH 类膝沟藻毒素(GTX1 和 GTX4), 导致 *A. minutum* 的细胞毒性和培养液毒性增加。而海水中氮磷比的进一步升高, 在一定程度上促进了微小亚历山大藻细胞毒素含量和毒性的增加, 但并未促进其生长, 且降低了藻细胞内的磷储量。

关键词: 氮磷比; 酸化环境; 微小亚历山大藻; 麻痹性贝毒素

中图分类号: P734 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2021)02-0001-10

DOI: 10.11759/hyxx20200909002

近年来, 人类活动导致大气中 CO₂ 含量迅速上升, 从工业革命开始时的 280 ppm 增至当今的 411 ppm^[1]。大气中 CO₂ 含量上升不仅会造成气候变暖, 还会导致海洋中溶解 CO₂ 含量增加和海水 pH 值降低。目前, 表层海水的平均 pH 值约为 8.10^[2], 预计到 2100 年将下降至 7.8 或 7.7, 到 2300 年将下降至 7.4~7.6, 将对海洋生态系统造成严重影响^[3]。富营养化是一种由于水体中氮和磷含量、相对比例或化学形态发生变化而导致水体中生产力, 尤其是有机质不断增加的过程^[4], 是水质退化的主要原因之一, 对世界上许多水生生态系统造成重大破坏^[5], 还会对人类健康和社会经济发展构成威胁^[6]。藻类作为最重要的初级生产者之一, 是海洋食物网的基础, 海水酸化和富营养化引起的海水环境变化势必也会影响到海洋藻类的生理机能。

随着全球气候问题的加剧, 海洋产毒藻在全球海域的分布范围越来越大^[7-8], 尤其是麻痹性贝毒(PST)毒素产毒藻^[9-10]。海洋环境中能够产生 PST 的微藻主要有微小亚历山大藻、链状亚历山大藻^[11-12]、链状裸甲藻^[13]和巴哈马梨甲藻^[14]等, 这些产毒甲藻在全球近岸海域广泛分布, 严重威胁近海养殖环境安全。其中, 文献报道我国多起 PST 中毒事件是由亚历山大藻属和裸甲藻属的部分有毒藻种造成的^[15-16]。

氮、磷作为产毒藻进行生理活动必需的营养元素^[3], 在富营养化的产生和赤潮的暴发中起着重要的驱动作用。有研究表明, 亚历山大藻细胞的毒性可能同时受到 N 和 P 浓度的影响, 并且随着 N/P 的变化而变化^[17]。从 PST 的化学结构式可以看出, N 元素含量约占 PST 分子的 30%, N 元素与亚历山大藻产毒有着十分密切的联系。关于酸化研究, 在室内培养实验中, 最初用化学方法调控培养液的 pH 值, 使用强酸模拟酸化环境, 探究 pH 变化对水生生物的影响。如用盐酸调节 pH 对云纹石斑鱼胚胎发育和仔鱼活力以及文蛤的呼吸与排泄进行研究^[18-19], 王越等^[20]通过用盐酸探究了 pH 对米氏凯伦藻生理代谢的影响。然而, 有毒甲藻在强酸调节的酸化海水中产毒响应的相关研究目前鲜有报道。目前在产毒藻

收稿日期: 2020-09-09; 修回日期: 2020-11-13

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2019MD026); 国家基金委-山东省联合基金(U1806202); 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室(中国科学院海洋研究所)开放基金(KLMEEES202003)

[Foundation: Shandong Province Natural Science Foundation of China, No. ZR2019MD026; National Natural Science Foundation of China-Shandong Joint Funded Project, No. U1806202; Open Fund of CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, No. KLMEEES202003]

作者简介: 郝爽(1996-), 女, 山东潍坊人, 在读硕士, 主要研究方向: 海洋酸化对亚历山大藻生长和产毒的影响, E-mail: 461802748@qq.com; 连子如, 通信作者, 副教授, E-mail: yoyo-lzr@hotmail.com.

对环境因子的响应方面的研究多是对温度、盐度、海水酸化或营养条件等单因素，而两个及两个以上因素的联合作用对有毒甲藻的影响研究较少，关于所释放的胞外毒素的浓度、组成等也没有明确报道。那么，在多种环境因子的联合作用下有毒甲藻产毒的规律是怎样，胞内外毒素组成、含量是否有明显差异，这些问题值得深入研究探讨。

基于以上论述，本工作选取我国近海典型产毒甲藻微小亚历山大藻(*A. minutum*)作为研究对象，通过强酸酸化方法，联合一定条件下的富营养化模式，构建基于氮浓度变化的不同氮磷比条件下的酸化海水环境，分析测定了胞内外毒素的含量组分以及藻密度、叶绿素含量等相关数据，初步探讨了在较高氮磷比条件下的酸化海水对 *A. minutum* 产毒的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与材料

G1969A 型飞行时间质谱仪和 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); ZIC-HILIC 色谱柱(德国 MERCK 公司); GTX1、GTX2、GTX3、GTX4 标准品(NRC-IMB), 用 0.1 mol/L 乙酸溶液稀释后浓度分别为 497 μg/L、903 μg/L、343 μg/L、162 μg/L; 产毒微小亚历山大藻分离自台湾海峡, 株号 AM-1。

1.2 藻的培养与收集

取天然海水, 经 0.22 μm 滤膜过滤后高温高压灭菌, 冷却至室温。以 NaNO₃ 作为氮源, NaH₂PO₄ 作为磷源, 微量元素和维生素的初始浓度按照 f/2 培养基配方添加, NaH₂PO₄ 初始浓度为 9.7±0.3 μmol/L, 通过改变 NaNO₃ 浓度改变培养液的氮磷比。向 500 mL 的锥形瓶中添加 300 mL 培养液, *A. minutum* 初始密度为 1×10³ 个/mL, 设置明暗比(L:D)为 12 h: 12 h、培养温度 20℃、光照强度 3 000 lx, 培养过程中定时摇动锥形瓶。每天用 1 mol/L 的盐酸和 1 mol/L 的 NaOH 溶液调控培养液的 pH 值。实验设置两个 pH 值(8.0, 7.5)和两个氮磷比(80:1, 40:1)共 4 个组合, 如表 1 所示。

表 1 实验组的设置

Tab. 1 Setting of the experimental group

实验组	I	II	III	IV
pH	8.0	7.5	8.0	7.5
N/P	80:1	80:1	40:1	40:1

培养周期为 34 天, 每隔 3 天收集 3 瓶藻液。从每个锥形瓶的 300 mL 藻液中各取 1 mL 混匀的培养液, 置于 2 mL 离心管中, 加入 1 滴 Lugol's 碘液, 用于藻细胞的计数; 各取 2 mL 混匀藻液抽滤至直径 25 mm 的 GF/F 膜上, 用于叶绿素 *a* 的测定; 将剩余藻液中藻细胞收集至 GF/A 膜上, 实现藻细胞与培养液的分离; 用孔径为 0.22 μm 的混合纤维滤膜对培养液进一步过滤。

1.3 测定方法

藻密度、叶绿素 *a* 及营养盐(NO₃-N、NO₂-N、NH₄-N 和 PO₄-P)的测定以及 *A. minutum* 胞内胞外 PST 的提取、富集和仪器检测方法参照文献[21-22]。溶解无机氮(DIN)为 NO₃-N、NO₂-N、NH₄-N 浓度之和。

1.4 数据分析

数据采用 SPSS 26.0 的 One-way ANOVA 和 LSD (Least Significant Difference, 最小显著性差异法)多重比较分析, *P*<0.05 为差异显著, *P*<0.01 为差异极显著; 使用 Origin 2018 软件绘图。

2 结果

2.1 对生长的影响

不同氮磷比条件下培养液酸化对 *A. minutum* 生长状况的影响如图 1 所示。各实验组 *A. minutum* 生长

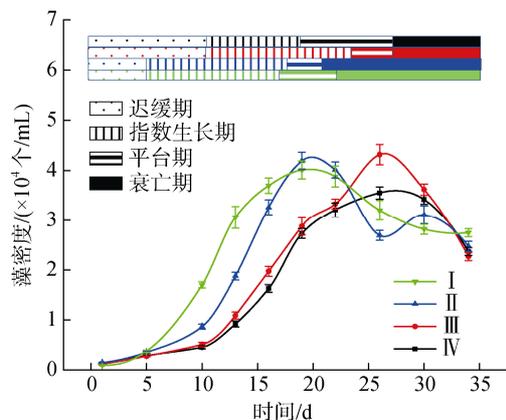


图 1 不同氮磷比条件下酸化环境对微小亚历山大藻密度的影响

Fig. 1 Effect of acidification on the density of *A. minutum* under different N/P ratios

注: 绿色代表实验组 I: pH=8.0, N/P=80:1; 蓝色代表实验组 II: pH=7.5, N/P=80:1; 红色代表实验组 III: pH=8.0, N/P=40:1; 黑色代表实验组 IV: pH=7.5, N/P=40:1。上方色条不同颜色代表不同实验组, 不同图案代表不同生长阶段, 不同长度代表不同时间长短

可分为四个阶段: 迟缓期、指数生长期、平台期和衰亡期。N/P=80 : 1 时, *A. minutum* 进入指数生长期和平台期的时间比 N/P=40 : 1 条件下提前 5 天左右, 适当降低培养液的 pH 值可以提高 *A. minutum* 的最大细胞数。N/P=40 : 1 时, pH=8.0 条件下 *A. minutum* 的最大细胞数反而显著高于 pH=7.5 条件。

2.2 对叶绿素 a 的影响

如图 2a 所示, *A. minutum* 叶绿素 a 含量在培养周期中先增加后减少, 与图 1 中微小亚历山大藻密度变化趋势基本一致。每个细胞内叶绿素 a 含量(pg/

细胞)的变化情况与单位体积含量($\mu\text{g/L}$)在不同实验条件下的相对关系基本一致, 除实验组 IV 中每个细胞内叶绿素 a 含量随生长周期不断减少之外, 其余三组的细胞叶绿素 a 含量在整个生长周期中变化不大(见图 2b)。从表 2 可以看出微小亚历山大藻密度与叶绿素 a 含量成正相关关系, 氮磷比的改变和酸化环境没有改变这种关系。在 *A. minutum* 的培养周期中, 叶绿素 a 含量随培养液 pH 值的变化而发生改变: 生长初期, 叶绿素 a 含量随培养液 pH 值的降低而降低; 进入指数生长期后, 培养液 pH 降低时 *A. minutum* 叶绿素 a 含量增加极为显著 ($P<0.01$)。

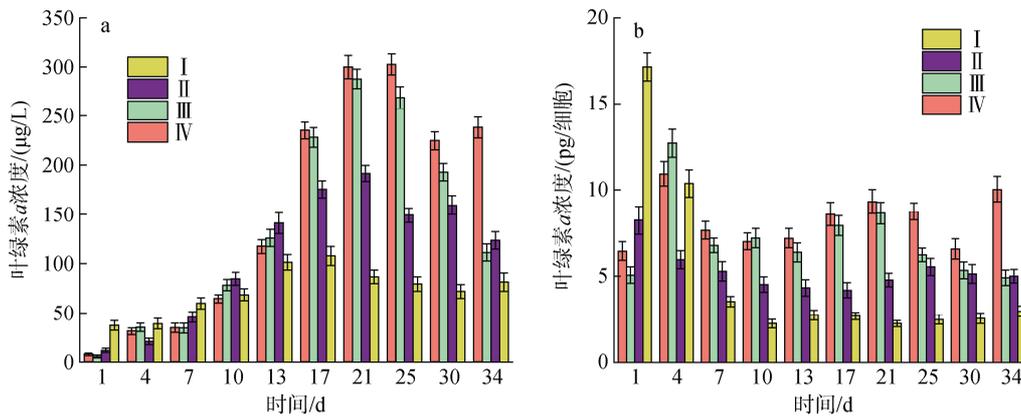


图 2 不同氮磷比条件下的酸化环境对微小亚历山大藻叶绿素 a 含量的影响

Fig. 2 Effect of acidification on the chlorophyll a content of *A. minutum* under different N/P ratios

a: 单位体积培养液中叶绿素 a 含量; b: 每个细胞内叶绿素 a 含量

注: I : pH=8.0, N/P=80 : 1, II : pH=7.5, N/P=80 : 1, III : pH=8.0, N/P=40 : 1, IV : pH=7.5, N/P=40 : 1

表 2 叶绿素 a 与藻密度的相关性

Tab. 2 Correlation between chlorophyll a and algal density

实验组	I	II	III	IV
皮尔逊相关系数	0.886	0.984	0.947	0.97

注: 皮尔逊相关系数可用来度量两个变量间相关程度, 介于 1 和 -1 之间, 其中, 1 表示变量完全正相关, 0 表示无关, -1 表示完全负相关。

2.3 对营养盐(DIN 和 PO₄-P)的测定

培养液中 DIN 和 PO₄-P 浓度变化趋势不同(图 3)。不同实验条件下的微小亚历山大藻在前五天快速吸收 PO₄-P, 四组实验分别吸收培养液中 PO₄-P 的 64.03%(I)、52.19%(II)、73.65%(III)和 62.58%(IV)。之后培养液中 PO₄-P 的含量没有明显变化。N/P=80 : 1 实验组培养周期内 DIN 的浓度大致呈现先减少后增加的趋势, 而 N/P=40 : 1 的两组培养液中 DIN 的浓度则随培养时间而减少。其中 NO₃-N 作为培养基中添加的唯一氮源, 与 DIN 的变化趋势基本一致; NH₄-N

浓度则随着 *A. minutum* 的生长呈现波动上升的趋势; NO₂-N 占 DIN 的比例不足 1%, 且对 *A. minutum* 的生长影响不大, 在此不予讨论。

2.4 对毒素的影响

为了更直观地比较不同氮磷比条件下的酸化培养液对 *A. minutum* 生长和产毒的影响, 根据 4 组实验的藻密度曲线选取五个点进行分析: 迟缓期(样品 1), 指数前期(样品 2), 指数后期(样品 3), 最大生物量所在的样品(样品 4), 衰亡期(样品 5)。

2.4.1 对 *A. minutum* 胞内毒素的影响

不同氮磷比条件下酸化培养液对 *A. minutum* 单位细胞毒素总量的影响见图 4。N/P=40 : 1 时, pH 的改变对指数期至衰亡期 *A. minutum* 单位细胞总毒素含量的影响并不明显 ($P>0.05$); 而当氮磷比较高 (N/P=80 : 1) 时, 与 *A. minutum* 藻细胞生长趋势不同, pH 的降低反而显著降低了 *A. minutum* 单位细胞总毒

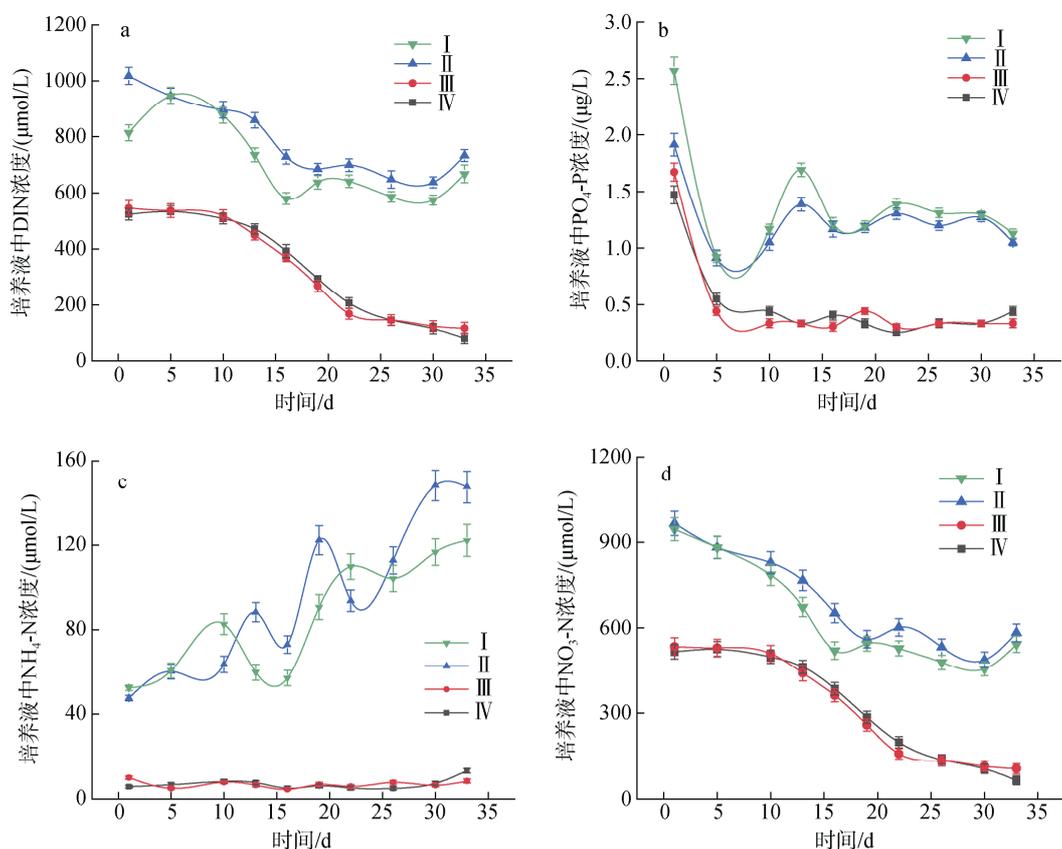


图3 不同氮磷比条件下酸化环境对微小亚历山大藻培养液中营养盐含量的影响

Fig. 3 Effects of acidification on nutrient content in *A. minutum* culture medium under different N/P ratios

注: I: pH=8.0, N/P=80 : 1; II: pH=7.5, N/P=80 : 1; III: pH=8.0, N/P=40 : 1; IV: pH=7.5, N/P=40 : 1

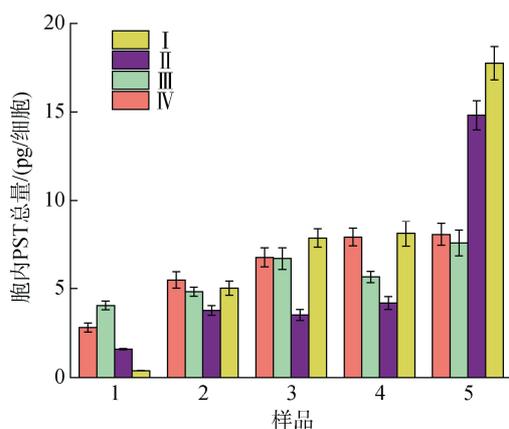


图4 不同氮磷比条件下酸化环境对微小亚历山大藻单位细胞毒素总量的影响

Fig. 4 Effect of acidification on the total amount of PST of an *A. minutum* cell under different N/P ratios

注: I: pH=8.0, N/P=80 : 1; II: pH=7.5, N/P=80 : 1; III: pH=8.0, N/P=40 : 1; IV: pH=7.5, N/P=40 : 1

素含量($P < 0.01$)。相同培养液 pH 条件下, N/P=80 : 1 条件下的 *A. minutum* 细胞在衰亡期积累的毒素迅速

增加, 含量比 N/P=40 : 1 条件下高出 57.8%(pH=8.0) 和 42.5%(pH=7.5)。

在不同生长时期 *A. minutum* 胞内 4 种 PST 总量及毒素组成如图 5 所示, 可以看出胞内 PST 总量随培养时间基本呈现增加的趋势, 尤其在 N/P=80 : 1 时, 毒素含量增加显著。胞内 GTX1 和 GTX4 随培养时间基本呈现增高的趋势, GTX2 和 GTX3 含量变化不大甚至减少。N/P=80 : 1 时, 4 种 PST 在迟缓期的含量随 pH 降低而增加, 而在指数期至衰亡期, 各毒素反而随 pH 的降低而降低。N/P=40 : 1 条件下, 在 pH 降低时各毒素含量除迟缓期外增加了 5.04%~62.38%。

2.4.2 对 *A. minutum* 胞外毒素的影响

不同氮磷比条件下酸化培养液对 *A. minutum* 胞外培养液中 PST 总量的影响如图 6 所示。相同 pH 条件下, N/P=80 : 1 时衰亡期之前胞外培养液的 PST 含量明显高于 N/P=40 : 1 条件, 而到衰亡期时, N/P=40 : 1 条件下培养液中 PST 迅速增加, 40/7.5 实验组中毒素含量超过 80/7.5 实验组。不同氮磷比

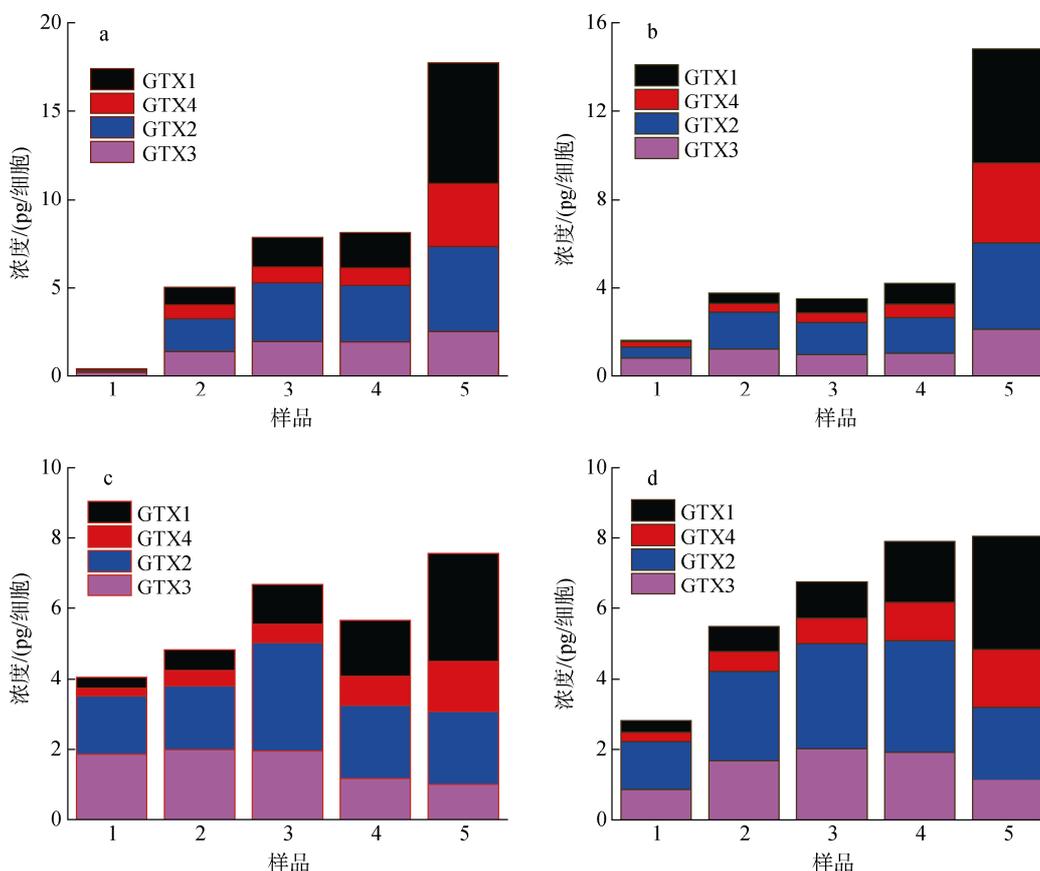


图 5 4 组实验微小亚亚历山大藻胞内 PST 总量的变化

Fig. 5 Changes in the total amount of intracellular PST in *A. minutum* in four experimental groups
a: pH=8.0, N/P=80 : 1; b: pH=7.5, N/P=80 : 1; c: pH=8.0, N/P=40 : 1; d: pH=7.5, N/P=40 : 1

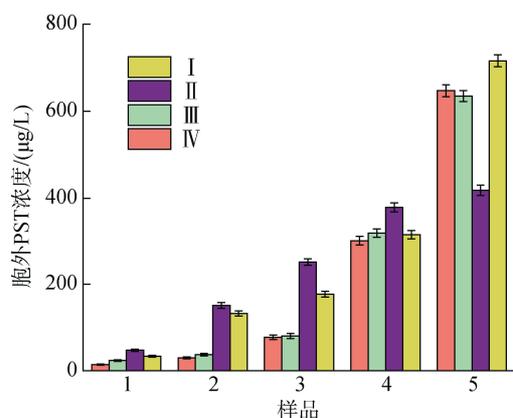


图 6 不同氮磷比条件下酸化环境对微小亚亚历山大藻胞外培养液中总毒素的影响

Fig. 6 Effects of acidification on the total amount of extracellular PST in *A. minutum* under different N/P ratios
注: I : pH=8.0, N/P=80 : 1; II : pH=7.5, N/P=80 : 1; III : pH=8.0, N/P=40 : 1; IV : pH=7.5, N/P=40 : 1

条件下 pH 对衰亡期之前的 *A. minutum* 胞外培养液中 PST 总量无明显影响, N/P=80 : 1 条件下的 *A. minu-*

tum 到达衰亡期时, pH=8.0 条件下的胞外 PST 含量迅速增加, 超过了较低 pH 条件下毒素含量 71.05%。

在不同生长时期 *A. minutum* 胞外培养液中 PST 含量以及毒素组成如图 7 所示(图中数据为三组平行实验结果的平均值), 胞外培养液中 PST 总量随培养时间均呈现增加的趋势。氮磷比较高(N/P=80 : 1)时, pH 降低并未显著促进 PST 总量的增加($P>0.05$), 但在衰亡期之前胞外培养液中 GTX2 和 GTX3 占比随 pH 降低而提高, GTX1 和 GTX4 与之相反, 在 pH=7.5 时其浓度较低; N/P=40 : 1 时, pH 变化对胞外培养液中 PST 的含量及组成无明显影响($P>0.05$)。

2.4.3 对 *A. minutum* 胞外毒素与胞内毒素比值的影响

本实验将 *A. minutum* 胞外培养液中 4 种 PST 与胞内进行比较, 得到单位体积中胞外培养液和胞内 4 种 PST 物质的量(nmol)以及毒素总量(nmol)的平均值的比值(图 8、图 9)。PST 总量的比值以及 GTX1、GTX4、GTX2、GTX3 各自比值的变化规律相似: 衰亡期之前, N/P=80 : 1 条件下二者比值高于 N/P=40 : 1 条件下的

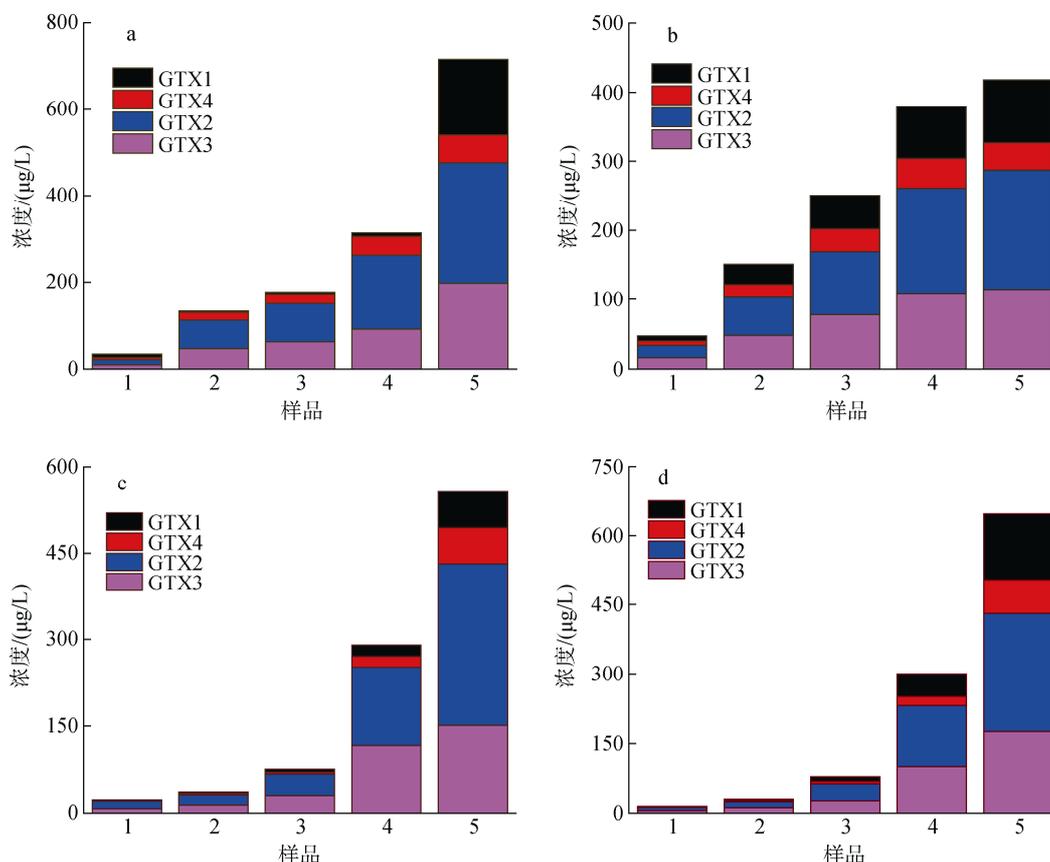


图 7 4 组实验微小亚历山大藻胞外培养液中 PST 总量的变化

Fig. 7 Changes in the total amount of extracellular PST of *A. minutum* in four experimental groups
a: pH=8.0, N/P=80 : 1; b: pH=7.5, N/P=80 : 1; c: pH=8.0, N/P=40 : 1; d: pH=7.5, N/P=40 : 1

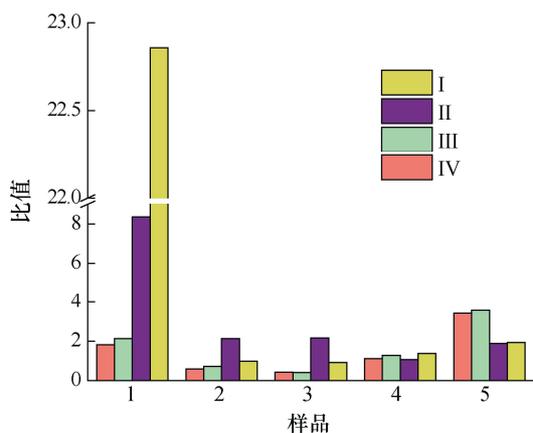


图 8 不同氮磷比条件下酸化环境对微小亚历山大藻胞外毒素与胞内毒素总量比值的影响

Fig.8 Effects of acidification on the ratio of total extracellular PST to total intracellular PST in *A. minutum* under different N/P ratios

注: I : pH=8.0, N/P=80 : 1; II : pH=7.5, N/P=80 : 1; III : pH=8.0, N/P=40 : 1; IV : pH=7.5, N/P=40 : 1

比值, 在迟缓期尤为明显($P<0.01$), 且迟缓期时随着 pH 的降低二者比值减小 59.2%。指数生长期胞外与胞内毒素的比值随着 pH 的降低而增加。衰亡期时, N/P=40 : 1 时的胞外/胞内毒素比值高出 N/P=80 : 1 条件下比值的 52.4%。所以, 较高氮磷比条件下, 特别是在迟缓期和指数期, 酸化环境对 *A. minutum* 胞外培养液中 4 种 PST 的含量与胞内的比值会产生影响($P<0.05$)。

3 讨论

现有的大多数关于酸化环境对亚历山大藻生长及产毒影响的研究是通过 CO_2 加富进行酸化实验。有研究显示, 由于碳浓缩机制的存在, CO_2 浓度的在一定范围内升高并不会对亚历山大藻的生长产生明显影响, 但会使与次级代谢产物生物合成、运输和分解代谢以及氨基酸运输相关的下调基因数量增加, 从而降低塔玛亚历山大藻株毒素含量^[23]。与通过

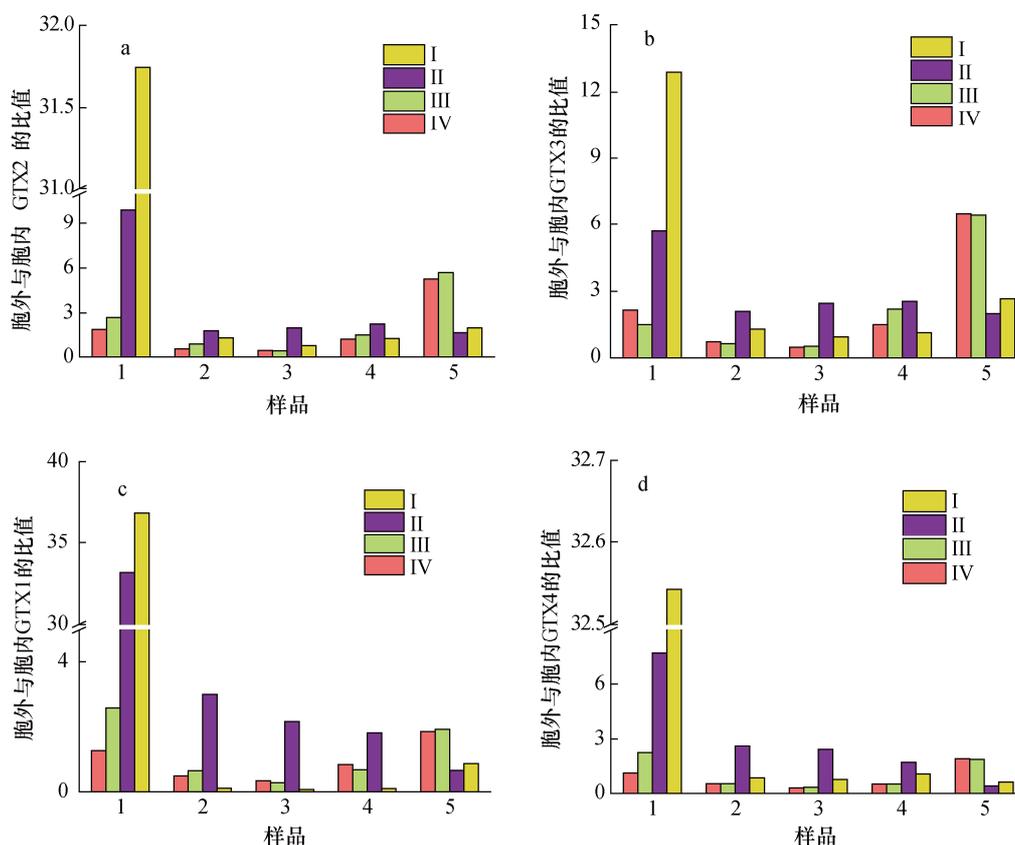


图9 不同氮磷比条件下酸化环境对微小亚历山大藻胞外与胞内不同毒素的比值的影响

Fig. 9 Effects of acidification on the ratios of different extracellular to intracellular toxins in *A. minutum* under different N/P ratios

注: I: pH=8.0, N/P=80:1; II: pH=7.5, N/P=80:1; III: pH=8.0, N/P=40:1; IV: pH=7.5, N/P=40:1

CO₂ 加富模拟酸化环境不同, 本实验采用盐酸来调节培养液的 pH, 探究高氮磷比条件下酸化环境对 *A. minutum* 生长和产毒的影响。

3.1 对 *A. minutum* 生长的影响

虽然氮是蛋白质和核酸等生命物质的重要组成元素, 但是在本实验中, 氮磷比较高(N/P=80:1)时并没有对产毒微小亚历山大藻的生长产生促进作用, 可能是过量氮在藻体内蓄积转变成有害物质, 从而对藻的生长造成不利影响。但 pH 值降低会促进有毒甲藻的生长, 增长速度快且最大生物量高, 进而引发危害程度更高的有毒赤潮。

A. minutum 产生的 PST 是一种富含氮的生物碱^[17], 而磷元素是 *A. minutum* 遗传物质核酸的重要组成成分之一^[24], *A. minutum* 细胞内 PST 含量与培养液营养状况密切相关。本研究显示 *A. minutum* 在培养的前五天快速吸收培养液中的 PO₄-P, 对 P 采取储存策略; 在培养周期的中后段, *A. minutum* 几乎不再从培养液

中吸收 P; 而 *A. minutum* 在整个生长过程中持续消耗氮, 对氮营养盐没有明显的储存策略。当细胞死亡破裂时, 胞内未吸收利用的 NO₃-N 可能会重新释放到培养液中, 导致培养后期培养液中 DIN 升高。N 在生物体内会发生转化, 部分 NO₃-N 可能在 *A. minutum* 中转化成 NH₄-N, 并随着的藻细胞生长周期被利用或释放。酸化环境下, 氮磷比的升高可能会降低 *A. minutum* 的磷储存能力而对藻的氮吸收能力没有明显的影响。

3.2 对 *A. minutum* 产毒的影响

氮磷比增加有利于 *A. minutum* 胞内 GTX1 和 GTX4 的占比的增加, 使 *A. minutum* 产生的 PST 向毒性更高的化合物转变, 其中衰亡期毒素含量更高。Mohamed 的观点可以解释这一现象: 亚历山大藻进入衰亡期后, 细胞分裂间期延长, 细胞分裂的速度减缓甚至停滞, 而 PST 合成酶的编码基因仍持续表达, PST 可持续合成^[25], 使得衰亡期的 *A. minutum* 胞

内 PST 高于其他生长时期。衰亡期的 *A. minutum* 胞外培养液中 PST 总量也比其他生长时期要高,可能原因有二:(1) 衰亡期微小亚历山大藻胞内 PST 含量高于其他生长时期,所以释放到胞外培养液中的 PST 也会更多;(2) 藻细胞进入到衰亡期,死亡、裂解速度加快,*A. minutum* 胞内的毒素直接进入培养基质,导致胞外 PST 含量升高。本实验的结果与 Lim 的研究结果基本一致,认为亚历山大藻细胞的毒性随着 N/P 的变化而变化,在不同的 N/P 处理下 *A. minutum* 的毒素组成相对稳定,在较高的 N/P 条件下培养的藻细胞的毒素含量也比较多^[17]。此外 Han 还发现,在高氮条件下的 PST 种类更加丰富^[26],这点在本实验中并未体现,可能存在实验藻株之间的差异。

较高氮磷比条件下的酸化环境使胞外培养液中 PST 含量比胞内增加的程度高。在指数前期之前,*A. minutum* 胞外培养液中 PST 的总量较胞内可高出 20 倍以上,这可能是处于酸化环境中的微小亚历山大藻为了提高在恶劣环境下的生存能力而向环境中释放更多的毒素来提高自身竞争力;也可能是酸化环境会提高藻细胞内相关酶的含量或活性^[27],进而促进藻细胞的生理代谢以及 PST 的合成与释放。综上所述,在富营养化条件下,日益严重的酸化情况可能会导致海水中 PST 含量与藻胞内的比值显著增加,严重威胁到海水环境。

4 结论

微小亚历山大藻对氮磷比和 pH 的变化较为敏感,在本实验中,酸化环境对 *A. minutum* 的生长、毒素含量和毒性有一定促进作用,可以推测日益酸化的海水环境或许在一定程度上会加剧 *A. minutum* 引起的有毒赤潮。但也有其他研究表明酸化对亚历山大藻生长和产毒有一定的抑制作用,可见酸化对亚历山大藻的影响十分复杂。酸化环境如何影响亚历山大藻的生长和产毒?不同酸化模式对亚历山大藻的作用机制是否一致?尚未有明确统一的定论。酸化环境下氮磷比增加并没有促进 *A. minutum* 的生长,且降低了其叶绿素 *a* 含量和对 P 的储存能力,但几乎没有影响到对硝氮的吸收能力。氮磷比的增加还促进了 *A. minutum* 胞内和胞外毒素含量和毒性的增加,这更加增大了 *A. minutum* 赤潮产生的环境危害。本研究通过探究无 CO₂ 参与的酸化环境和氮加富的共同作用对微小亚历山大藻生长产毒的影响,以期为酸化和富营养化条件下的微藻产毒提供更多研究基础。

参考文献:

- [1] Bautista-Chamizo E, Sendra M, De Orte M R, et al. Comparative effects of seawater acidification on microalgae: Single and multispecies toxicity tests[J]. *Science of The Total Environment*, 2019, 649: 224-232.
- [2] Ken C, Michael E W. Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH[J]. *Nature*, 2003, 425(6956): 325-325.
- [3] 石莉, 桂静, 吴克勤. 海洋酸化及国际研究动态[J]. *海洋科学进展*, 2011, 29(1): 122-128.
Shi Li, Gui Jing, Wu Keqin. Developments in international studies on ocean acidification[J]. *Advances in Marine Science*, 2011, 29(1): 122-128.
- [4] Bricker S B, Ferreira J G, Simas T, et al. An integrated methodology for assessment of estuarine trophic status[J]. *Ecological Modelling*, 2003, 169(1): 39-60.
- [5] Smith V H. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2003, 10(2): 126-139.
- [6] Sharmin A, Hai M A, Hossain M M, et al. Reducing excess phosphorus in agricultural runoff with low-cost, locally available materials to prevent toxic eutrophication in hoar areas of Bangladesh[J]. *Groundwater for Sustainable Development*, 2020, 10: 100348.
- [7] Dannevig H, Groven K, Hovelsrud G K, et al. A framework for agenda-setting ocean acidification through boundary work[J]. *Environmental Science & Policy*, 2019, 95: 28-37.
- [8] Chen J H, Gao L Y, Li Z Y, et al. Simultaneous screening for lipophilic and hydrophilic toxins in marine harmful algae using a serially coupled reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography separation system with high-resolution mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 914: 117-126.
- [9] Vilariño N, Louzao M C, Abal P, et al. Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection[J]. *Toxins*, 2018, 10(8): 324.
- [10] Montoya N G, Carignan M O, Carreto J I. *Alexandrium tamarense/catenella* blooms in the Southwestern Atlantic: Paralytic shellfish toxin production and its trophic transference[J]. *Plankton Ecology of the Southwestern Atlantic*, 2018, 453-476.
- [11] Anderson D M, Alpermann T J, Cembella A, et al. The globally distributed genus *Alexandrium*: multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health[J]. *Harmful Algae*, 2012, 14: 10-35.
- [12] Abdenadher M, Hamza A, Fekih W, et al. Factors determining the dynamics of toxic blooms of *Alexandrium minutum* during a 10-year study along the shallow southwestern Mediterranean coasts[J]. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 2012, 106: 102-111.

- [13] Oshima Y, Hasegawa M, Yasumoto T, et al. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish[J]. *Toxicon*, 1987, 25: 1105-1111.
- [14] Azanza R V, Taylor F J. Are pyrodinium blooms in the Southeast Asian region recurring and spreading? A view at the end of the millennium[J]. *Ambio*, 2001, 30: 356-364.
- [15] 邹迎麟, 朱明远, Hall S. 两种亚历山大藻产毒过程和毒素特征研究[J]. *黄渤海海洋*, 2001, 19(3): 65-70.
Zou Yinglin, Zhu Mingyuan, Hall S. Prodyction and characteristic of paralytic shellfish toxins in two species of *Alexandrium*[J]. *Journal of Oceano Graphy of Huanghai & Bohai Seas*, 2001, 19(3): 65-70.
- [16] 于仁成, 周名江. 麻痹性贝毒研究进展[J]. *海洋与湖沼*, 1998, 29(3): 330-338.
Yu Rencheng, Zhou Mingjiang. Advances in research of paralytics shellfish poisoning[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 1998, 29(3): 330-338.
- [17] Lim P, Leaw C, Kobiyama A, et al. Growth and toxin production of tropical *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) under various nitrogen to phosphorus ratios[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22(2): 203-210.
- [18] 宋振鑫, 陈超, 吴雷明, 等. 盐度与 pH 对云纹石斑鱼胚胎发育和仔鱼活力的影响[J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(6): 52-58.
Song Zhenxin, Chen Chao, Wu Leiming, et al. Effects of salinity and pH on the embryonic development and larval activity of kelp bass *Epinephelus moara*[J]. *Progress in Fishery Sciences*. 2013, 34(6): 52-58.
- [19] 杨杰青, 蒋玫, 李磊, 等. pH、盐度对文蛤呼吸、排泄的影响[J]. *海洋渔业*, 2016, 38(4): 406-414.
Yang Jieqing, Jiang Mei, Li Lei, et al. Effects of pH and salinity on respiration and excretion of *Meretrix meretrix*[J]. *Marine Fisheries*, 2016, 38(4): 406-414.
- [20] 王越, 沈益绿, 赵世焯, 等. pH 对米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*) 种群生长、营养吸收及无机碳亲和力的影响[J]. *海洋环境科学*, 2015, 34(4): 488-493.
Wang Yue, Shen Anglv, Zhao Shiye, et al. Effects of pH limitation on population growth, nutrient uptake and photosynthesis physiological processes of *Karenia mikimotoi*[J]. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(4): 488-493.
- [21] 刘丽君. 基于液质联用分析的富营养化和酸化环境对微小亚历山大藻生长和产毒的影响[D]. 山东济南: 山东大学硕士学位论文, 2020.
Liu Lijun. Effects of eutrophication and acidification environment on the growth and toxin production of *Alexandrium minutum* based on liquid chromatography-mass spectrometry[D]. Jinan, Shandong Province: Thesis for master degree of Shandong University, 2020.
- [22] Liu L J, Chen J H, He X P, et al. First determination of extracellular paralytic shellfish poisoning toxins in the culture medium of toxigenic dinoflagellates by HILIC-HRMS[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 204: 111042.
- [23] Van de Waal D B, Eberlein T, John U, et al. Impact of elevated pCO₂ on paralytic shellfish poisoning toxin content and composition in *Alexandrium tamarense*[J]. *Toxicon*, 2014, 78: 58-67.
- [24] Yang I, Beszteri S, Tillmann U, et al. Growth- and nutrient-dependent gene expression in the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium minutum*[J]. *Harmful Algae*, 2011, 12: 55-69.
- [25] Mohamed L, Yves C, Estelle M, et al. Influence of environmental factors on the paralytic shellfish toxin content and profile of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) isolated from the Mediterranean Sea[J]. *Marine Drugs*, 2013, 11(5): 1583-1601.
- [26] Han M, Lee H, Anderson D M, et al. Paralytic shellfish toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium pacificum* (Chinhae Bay, Korea) in axenic, nutrient-limited chemostat cultures and nutrient-enriched batch cultures[J]. *Marine Pollution Bulletin*. 2016, 104: 34-43.
- [27] Liu C X, Zou D H. Effects of elevated CO₂ on the photosynthesis and nitrate reductase activity of *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) grown at different nutrient levels[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2015, 33(2): 419-429.

Effects of acidification and high N/P ratios on toxin production in *Alexandrium minutum*

HAO Shuang^{1, 2}, LIU Li-jun¹, CHEN Jun-hui², HE Xiu-ping², LIAN Zi-ru¹

(1. Marine College, Shandong University, Weihai 264209, China; 2. Key Laboratory of Marine Eco-Environmental Science and Technology, The First Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Qingdao 266061, China)

Received: Sep. 9, 2020

Key words: N/P ratios; acidification; *Alexandrium minutum*; PST

Abstract: In this paper, paralytic shellfish toxin (PST)-producing algae were cultivated under laboratory-simulated seawater eutrophication and acidification conditions, using the algae cell counting method, spectrophotometry, HPLC-MS, and other analytical methods, to explore the effects of an acidified seawater environment under different N/P ratios on *Alexandrium minutum* growth, nitrogen and phosphorus nutrient absorption, toxicity, and other parameters. The results showed that acidified seawater promoted, to a certain extent, the growth and intracellular accumulation and extracellular release of PST in *A. minutum* and, to a greater extent, the extracellular PST content. Meanwhile, acidification promoted the oxidation of less toxic N-H gonyautoxin (GTX2 and GTX3) into more toxic N-OH gonyautoxin (GTX1 and GTX4), leading to increased cytotoxicity of *A. minutum* and toxicity in the culture medium. The increased N/P ratio in seawater had the benefit of elevating the toxin content and toxicity of *A. minutum* to a certain extent but did not promote the growth of *A. minutum* and decreased the intracellular phosphorus reserves.

(本文编辑: 赵卫红)