

# 赤潮过程中塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamareme*) C、N 稳定同位素组成的变化规律

刘 瑀<sup>1</sup>, 王海霞<sup>2</sup>, 李晓琳<sup>1</sup>, 李 颖<sup>2</sup>

(1. 大连海事大学 环境科学与工程学院, 辽宁 大连 116026; 2. 大连海事大学 航海学院, 辽宁 大连 116026)

**摘 要:** 为了探索赤潮监测预防的新思路和方法, 本研究选取典型赤潮藻(塔玛亚历山大藻 *Alexandrium tamareme*) 作为实验藻种, 模拟一次完整的赤潮形成过程, 测定重要监测指标(生物量、营养盐浓度)的变化, 找出稳定同位素特征值与之相关变化规律。实验结果表明, 藻种生长过程可明显分为四个阶段: 适应期、对数生长期、稳定生长期及衰亡期; N、P 浓度随培养时间呈下降趋势, 与生物量的变化有很好的相关性, 但在生长过程中几乎不吸收硅酸盐。在一次完整的赤潮发生过程中, C 稳定同位素组成( $\delta^{13}\text{C}$  值) 随时间显示出减小趋势, 而 N 稳定同位素组成( $\delta^{15}\text{N}$  值) 值则显示增大趋势。因此, 赤潮藻的 C 和 N 稳定同位素组成为赤潮监测提供了可能的新指标和新方法。

**关键词:** 塔玛亚历山大藻; 营养盐; 稳定同位素

中图分类号: X171

文献标识码: A

文章编号: 1007-6336(2015)05-0783-05

## Variation of carbon and nitrogen stable isotope composition of *Alexandrium tamareme* in the process of red tide

LIU Yu<sup>1</sup>, WANG Hai-xia<sup>2</sup>, LI Xiao-lin<sup>1</sup>, LI Ying<sup>2</sup>

(1. College of Environmental Science and Engineering, Dalian Maritime University, Dalian 116026, China; 2. Navigation College, Dalian Maritime University, Dalian 116026, China)

**Abstract:** In order to explore a new method for the red tide monitoring, this study selected one of the typical red tide algae, *Alexandrium tamareme*, as experimental material. We simulated a complete algal bloom process and examined the important monitoring index (biomass, nutrient concentration), find out the rule of the correlation with stable isotope characteristic value. The results show that algae growth process can be obviously divided into four stages: the adaptation period, the logarithmic growth phase, stable growth phase and decline phase; N, P nutrient concentration decreased with the incubation time, there is a good correlation with the change of biomass in the growth process, but almost no absorption of silicate. In a complete algal bloom process, the stable carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) shows decrease tendency, while the stable nitrogen isotope composition ( $\delta^{15}\text{N}$ ) reveals increase tendency. Therefore, the stable isotope composition can provide new indexes and possible new methods for the red tide monitoring.

**Key words:** *Alexandrium tamareme*; nutrient; stable isotope composition

近年来,大量的工农业废水与生活污水排放入海,海洋环境污染日趋严重,赤潮发生频率加

大,而且程度益重,中国的四大海域都有过赤潮报道,因此赤潮灾害已经引起高度重视<sup>[1]</sup>。国内外

收稿日期:2014-09-28,修订日期:2015-01-11

基金项目:国家海洋公益项目(2012418012-02);中央高校基本科研业务费专项资金项目(3132015020)

作者简介:刘 瑀(1965-),男,陕西西安人,教授,主要从事海洋环境化学领域的研究,E-mail:ylsibo@foxmail.com

对于赤潮的研究大部分把营养盐的变化对赤潮生物生长影响的规律作为基本内容<sup>[2]</sup>,其中徐宁等<sup>[3]</sup>综述了赤潮的发生与沿岸海域富营养化的关系。刘保占等<sup>[4]</sup>曾对不同培养条件下的赤潮藻稳定同位素进行研究分析,海水中营养盐的含量会通过影响赤潮藻细胞的生化组成,导致微藻稳定同位素组成的变化<sup>[5]</sup>,但目前研究稳定同位素技术与生物量、营养盐浓度变化之间对应关系的报道尚较少。稳定同位素技术可以有效地揭示有机物质的循环路径,而且采集样品对实验过程的影响很小,可以成为探索赤潮机理的可能的新技术手段。

本研究所选用的塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamareme*)是中国近海典型有毒赤潮藻种,可产生的麻痹性贝毒(PSP)<sup>[6]</sup>,由其所形成的赤潮在我国许多海域均有报道<sup>[7]</sup>。研究目的是根据赤潮过程伴随营养状况如碳源及氮源等的变化,赤潮藻类对生源元素的选择性吸收将导致C、N稳定同位素的动力学分馏这一理论,通过对塔玛亚历山大藻在正常营养盐的培养下,实验室模拟一次赤潮生消过程,观察其营养盐浓度变化及 $\delta^{13}\text{C}$ 值和 $\delta^{15}\text{N}$ 值的变化特征,对富营养化与赤潮藻类C、N稳定同位素之间的关系进行初步探索,为赤潮的预防和治理提供新的思路和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种来源及培养

本实验所使用的塔玛亚历山大藻(*A. tamareme*)由国家海洋环境监测中心提供。

培养方法:培养海水取自大连黑石礁海域,经过滤,高温灭菌5 min后使用,盐度30, pH 7.7。冷却后,加入Conway培养液和维生素,接入藻种,初始密度为 $1 \times 10^4/\text{mL}$ <sup>[8]</sup>,在SPX-GB-300型恒温光照培养箱中培养,光照度3000 lx,温度 $(20 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ ,光暗周期12 h: 12 h<sup>[9]</sup>,每天摇动培养瓶4次,防止藻细胞附壁或下沉。

### 1.2 藻种密度及生长率测定方法

实验所采用的计数方法为浮游植物计数框法<sup>[10]</sup>,通过计数来观察赤潮藻种的生长情况。

细胞的数量 $N$ 用下列公式进行计算:

$$N = \frac{Cs}{FsFn} \cdot \frac{V}{v} \cdot Pn \quad (1)$$

式中: $Cs$ 为浮游植物计数框的面积(400

$\text{mm}^2$ ); $Fs$ 为每个计数视野的面积( $\text{mm}^2$ ); $Fn$ 为计数视野个数; $V$ 为藻液的体积(1 mL); $v$ 为浮游植物计数框容积(0.1 mL); $Pn$ 为计数 $Fn$ 个视野所测得的浮游植物个体数。

### 1.3 营养盐浓度测定及稳定同位素组成分析

本研究测定5种营养盐浓度,硝酸盐( $\text{NO}_3\text{-N}$ )、亚硝酸盐( $\text{NO}_2\text{-N}$ )、铵盐( $\text{NH}_4\text{-N}$ )、磷酸盐( $\text{PO}_4\text{-P}$ )和硅酸盐( $\text{SiO}_3\text{-Si}$ ),测定方法分别为钼锑还原比色法(GB 12763.4)、萘乙二胺分光光度法(GB 17378.4-1998)、次溴酸盐氧化法(GB 17378.4-1998)、磷钼蓝分光光度法(GB 12763.4)和硅钼黄法(GB 12763.4)<sup>[11]</sup>。

通过对培养藻种计数确定其生长阶段,样品通过450℃灼烧过的GF/F滤膜,60℃条件烘干24 h,用于稳定同位素组成测定。所得样品经元素分析仪(Flash EA 1112, Thermo Fisher Scientific, USA)和稳定同位素质谱仪(Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific, USA)测定其 $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{13}\text{C}$ 值,稳定C、N同位素的自然丰度表示为:

$$\delta X = \frac{R_{\text{样品}} - R_{\text{标准}}}{R_{\text{标准}}} \times 1000 \quad (2)$$

式中: $X$ 代表 $^{13}\text{C}$ 或 $^{15}\text{N}$ ;  $R$ 代表 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 或 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 。 $\delta^{13}\text{C}$ 值是相对于PDB标准的自然丰度, $\delta^{15}\text{N}$ 值是相对空气中氮气的丰度。 $\delta^{13}\text{C}$ 的分析精度为 $\pm 0.10\text{‰}$ , $\delta^{15}\text{N}$ 的分析精度为 $\pm 0.20\text{‰}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 塔玛亚历山大藻的生长情况

由图1看出,微藻的生长趋势大致分为4个阶段:1~4 d,藻细胞数量没有明显的增长,微藻处于环境适应期;7~20 d左右,藻细胞数量大幅度增长,为对数生长期;20~35 d,微藻细胞数量基本维持不变,为稳定生长期;35 d之后,通过显微镜观察,藻细胞的外壁有不同程度的破损,细胞数量也随之下降,进入衰亡期。塔玛亚历山大藻生长达到的最大细胞数量为 $5.8 \times 10^5/\text{mL}$ 。日本赤潮专家安达六郎认为<sup>[12]</sup>,若赤潮生物细胞大小在10~29  $\mu\text{m}$ ,其细胞数量达到 $1 \times 10^3/\text{mL}$ 以上,则视为发生赤潮;宋秀凯等<sup>[13]</sup>监测结果显示:赤潮发生时,最大细胞丰度达到 $2.334 \times 10^5/\text{mL}$ 。不同专家对此持不同观点可能是针对不同条件、不同海区得到的结论。宋秀凯等的监测区域是中国海区,赤潮藻种也正是塔玛亚历山大藻,所以本

实验沿用此观点(图1中虚线所示)可认为模拟赤潮生消过程已基本达到实际赤潮的微藻数量。在赤潮发生区,海域开阔地区,赤潮持续4 d左右,在内湾区,海水交换能力弱,赤潮持续了10 d左右才开始消退<sup>[14]</sup>。本实验结果与以上研究基本一致。

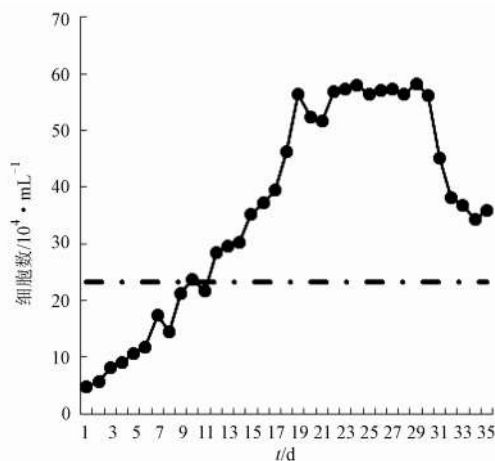


图1 塔玛亚历山大藻生长曲线

Fig. 1 The growth curve of *A. tamareme*

## 2.2 塔玛亚历山大藻对营养盐的吸收情况

由图2可以看出,塔玛亚历山大藻初期利用 $\text{NO}_3\text{-N}$ 时, $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 均有不同程度的上升。在第15 d, $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度相对较低时, $\text{NH}_4\text{-N}$ 浓度快速消耗,在第25 d左右, $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度几乎消耗殆尽(0.248 mg/L)时, $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度开始消耗。有研究表明,藻类利用N源,优先利用 $\text{NH}_4\text{-N}$ ,直到 $\text{NH}_4\text{-N}$ 几乎消失后才利用 $\text{NO}_3\text{-N}$ <sup>[15]</sup>。这是由于 $\text{NH}_4\text{-N}$ 吸收需要较少的能量,而 $\text{NO}_3\text{-N}$ 必须经过氧化态转变才能被利用。而本实验结果却并非如此,这可能是由于藻细胞对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸收主要取决于细胞的谷氨酰胺合成的活力,所以不同微藻对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸收利用能力会有所不同。Lin<sup>[16]</sup>研究得到微藻夏季吸收 $\text{NH}_4\text{-N}$ ,春季吸收 $\text{NO}_3\text{-N}$ ,所以另外一个可能的原因是对于N源的选择可能会受到温度、光照等其它环境因子的影响。由本实验结果可推测出,微藻对氮的吸收利用究竟以何种形态为主一方面取决于浮游植物的种类和其外部周围环境,另一方面还与环境中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 及 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的相对浓度密切相关。本实验中以 $\text{NO}_3\text{-N}$ 为主要添加氮源,故海水中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度远高于 $\text{NH}_4\text{-N}$ ,所以微藻主要以 $\text{NO}_3\text{-N}$ 作为氮源。

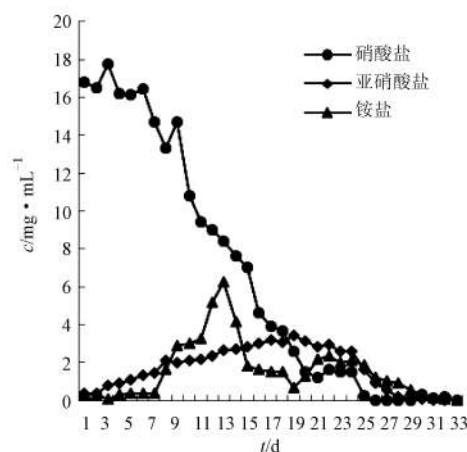


图2 塔玛亚历山大藻对三种氮源的吸收情况

Fig. 2 Absorption of three kinds of nitrogen source by *A. tamareme*

在本次实验过程中所配置的培养液中并没有添加 $\text{NO}_2\text{-N}$ ,但在塔玛亚历山大藻的培养液中检测到 $\text{NO}_2\text{-N}$ ,由此结果推测, $\text{NO}_2\text{-N}$ 的形成主要是微藻同化 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的结果。由于 $\text{NO}_2\text{-N}$ 不像 $\text{NO}_3\text{-N}$ 那样在藻体中有 $\text{NO}_3\text{-N}$ 库贮藏过量的 $\text{NO}_3\text{-N}$ <sup>[17]</sup>,因此,当 $\text{NO}_3\text{-N}$ 同化效率较高,细胞介质中累积大量 $\text{NO}_2\text{-N}$ ,产生的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 不能马上进一步完全被利用进而被释放出来。随着细胞的生长 $\text{NO}_3\text{-N}$ 逐渐被藻类利用,生长到稳定期时, $\text{NO}_3\text{-N}$ 已被消耗殆尽,在这种N源浓度较低的情况下,微藻又可重吸收释放出的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 进行利用。

微藻对N的吸收会受到N形态及同位素分馏的影响,包苑榆等<sup>[18]</sup>的研究表明不同形态N的影响要远远大于同位素分馏的影响。

塔玛亚历山大藻对 $\text{PO}_4\text{-P}$ 和 $\text{SiO}_3\text{-Si}$ 的吸收情况如图3所示。

由图3可知,P是微藻必不可少的生源元素,相对于N源来说,P源消耗量较少,这是由于藻细胞中需P元素参与合成的ATP、核酸等化合物含量较少。

在生长初期阶段塔玛亚历山大藻对 $\text{PO}_4\text{-P}$ 的消耗量,在第22 d左右,进入稳定生长期后, $\text{PO}_4\text{-P}$ 含量低于检测线以下。由图1可知塔玛亚历山大藻并没有因营养盐的缺乏造成生物量明显变化,依旧保持了较长时间的稳定期。有研究表明藻细胞具有储存 $\text{PO}_4\text{-P}$ 的功能<sup>[19]</sup>,可以吸收过量的 $\text{PO}_4\text{-P}$ 以聚磷酸盐形式储存于胞内,所以根据实验结果推测塔玛亚历山大藻藻细胞是具有这项功能的。所以当培养液中P源充足时,藻体利用

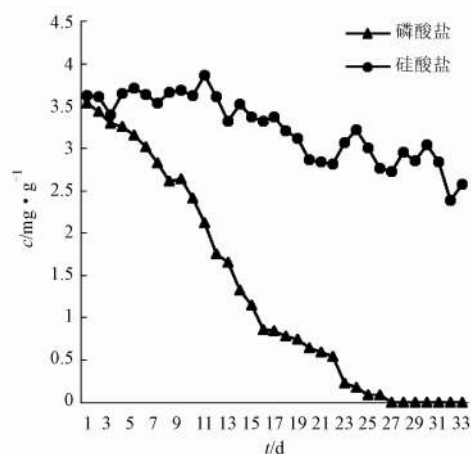


图3 塔玛亚历山大藻对磷酸盐和硅酸盐的吸收情况

Fig. 3 the absorption of phosphate and silicate by *A. tamarense*

培养液中 P 源维持细胞正常增殖,并不消耗细胞内储存的 P 源;当培养液中 P 源匮乏时,细胞利用储存的 P 源维持细胞生长代谢。

塔玛亚历山大藻在整个生长过程中,培养液中  $\text{SiO}_3\text{-Si}$  的浓度几乎没有改变,这表明塔玛亚历山大藻在增殖过程中几乎不消耗  $\text{SiO}_3\text{-Si}$ 。

### 2.3 塔玛亚历山大藻稳定同位素组成变化情况

塔玛亚历山大藻 C、N 稳定同位素组成变化如图 4 所示。

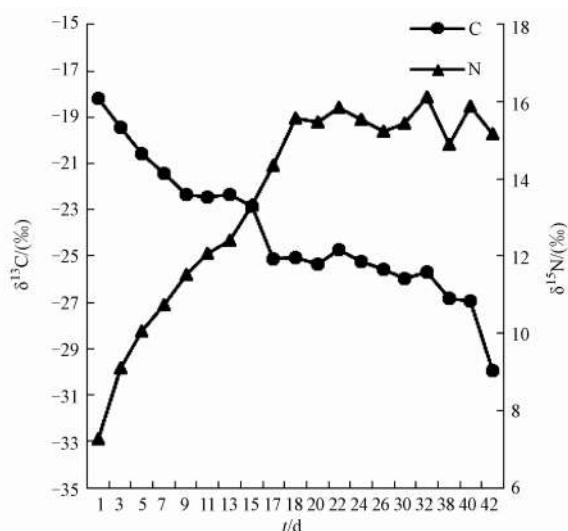


图4 塔玛亚历山大藻 C、N 稳定同位素组成变化

Fig. 4 Stable carbon and nitrogen isotope signatures ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ) of *A. tamarense*

塔玛亚历山大藻在适应期和对数生长期的  $\delta^{13}\text{C}$  值变化范围为  $(-25.127 \pm 0.208)\text{‰} \sim (-18.187 \pm 0.17)\text{‰}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  值变化范围为  $(7.267 \pm 0.06)\text{‰} \sim (15.575 \pm 0.004)\text{‰}$ 。在稳定期和衰

亡期的  $\delta^{13}\text{C}$  值变化范围为  $(-29.9625 \pm 0.27)\text{‰} \sim (-25.3315 \pm 0.21)\text{‰}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  值变化范围为  $(15.472 \pm 0.28)\text{‰} \sim (16.1375 \pm 0.344)\text{‰}$ 。微藻类,  $\delta^{13}\text{C}$  的特征值通常变化范围很大,其范围是从  $-58.8\text{‰} \sim -3.6\text{‰}$  [20]。

微藻对营养盐的选择性吸收表现为:在生长分裂过程初期,营养条件充足的情况下会优先选择较轻的  $^{12}\text{C}$  和  $^{14}\text{N}$  进行吸收,导致同位素分馏,而在生物量增加,营养元素匮乏时,微藻被迫利用较重的  $^{13}\text{C}$  和  $^{15}\text{N}$ ,则导致更正的  $\delta^{13}\text{C}$  和  $\delta^{15}\text{N}$  值。

由图 4 可观察到,  $\delta^{13}\text{C}$  值随着培养时间显示出更负的值,  $\delta^{15}\text{N}$  值则显示更正的值。由于本实验培养塔玛亚历山大藻模拟赤潮过程中,实验环境与自然环境相比物理、化学条件等均有所差异,虽然可以观察到完整的赤潮过程,但对数期持续时间较长,生长率与自然条件下赤潮藻类爆发式生长有一些差距,导致对 C 源的吸收不同。实验藻类开放式培养,光合作用利用海水中游离  $\text{CO}_2$ , 由于生长率相对缓慢,大气与培养液之间的  $\text{CO}_2$  交换可以满足指数期藻细胞生长和分裂,微藻会优先选择较轻的  $^{12}\text{C}$ , 使  $^{12}\text{C}$  在藻细胞中富集,导致同位素分馏,所以对数期的  $\delta^{13}\text{C}$  值向更负的趋势发展;进入稳定期后,藻细胞数量维持在一个很大的数值,对 C 源的大量需求造成短暂的 C 限制,限制了同位素分馏,所以相对的  $\delta^{13}\text{C}$  值在稳定期也维持稳定。而进入衰亡期,藻细胞由于营养盐限制、空间限制等原因大量死亡,对 C 源的消耗与海水交换速率重新达到平衡,藻类又富集较轻的  $^{12}\text{C}$ , 此外,还有富集了较重的  $^{13}\text{C}$  的老的藻细胞的死亡解体,总的  $^{13}\text{C}$  的比例减少,即产生更负的  $\delta^{13}\text{C}$  值 [21]。Andreas [20] 研究表明,微藻指数期  $\delta^{13}\text{C}$  值低于同种稳定期,与本实验结果不同,他认为  $\delta^{13}\text{C}$  值的变化是由于 C 源不同的一个效应,在对数期藻类以  $\text{CO}_2$  为主要 C 源,而稳定期则是  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  的  $\delta^{13}\text{C}$  值平均比游离态的  $\text{CO}_2$  高  $7\text{‰}$  左右,所以稳定期有更正的值。

在海洋环境中,浮游植物在 N 循环,从而也在  $\delta^{15}\text{N}$  动力学分馏过程中起核心作用 [22]。实验过程中 N 源是在实验开始一次性添加到培养液中,所以在对数期 N 源是相对充足的,藻类会选择性吸收  $^{14}\text{N}$ , 由图 2 可知, N 源  $\text{NO}_3\text{-N}$  随着赤潮发生浓度急剧下降,在培养后期, N 源缺乏,微藻只能利用  $^{15}\text{N}$ , 导致更正的  $\delta^{15}\text{N}$  值。对应生物量

来看(图1), $\delta^{15}\text{N}$ 值与之有很好的相关性,在藻类进入稳定期时, $\delta^{15}\text{N}$ 值基本保持稳定,一是由于对N源的快速吸收限制同位素分馏,二是在稳定期26 d左右时 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度已低于检测线。所以由实验结果推测,在赤潮期间,更正 $\delta^{15}\text{N}$ 值是可以预见的。

### 3 结 论

塔玛亚历山大藻对 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 这3种N源均能利用,可以利用储存的 $\text{PO}_4\text{-P}$ 继续生长和分裂,在整个生长周期中过程中几乎不消耗 $\text{SiO}_3\text{-Si}$ ,并且在N、P营养盐消耗殆尽后,藻种进入衰亡期,表明N、P营养盐确是赤潮过程中重要限制因子。

塔玛亚历山大藻在适应期和对数生长期的 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化范围为( $-25.127 \sim -18.187$ )‰, $\delta^{15}\text{N}$ 值变化范围为( $7.267 \sim 15.575$ )‰。在稳定期和衰亡期的 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化范围为( $-29.9625 \sim -23.3315$ )‰, $\delta^{15}\text{N}$ 值变化范围为( $15.472 \sim 16.1375$ )‰。在一次完整的赤潮生消过程中, $\delta^{13}\text{C}$ 值随时间显示出更负的值, $\delta^{15}\text{N}$ 值则显示更正的值。 $\delta^{13}\text{C}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$ 值是可以准确反映藻种生长状况及营养盐利用情况的。

### 参考文献:

- [1] 刘沛然,黄先玉,柯 栋. 赤潮成因及预报方法[J]. 海洋预报, 1999,16(4):46-51.
- [2] 黄晓航,史冬梅,张京浦,等. 赤潮发生机理研究——海洋原甲藻的氮营养生理特征[J]. 海洋与湖沼,1997,28(1):33-38.
- [3] 徐 宁,吕颂辉,段舜山,等. 营养物质输入对赤潮发生的影响[J]. 海洋环境科学,2004,23(2):21-24.
- [4] 刘保占,刘 瑀,李 颖,等. 不同氮磷比对海洋赤潮藻碳、氮稳定同位素组成的影响[J]. 水产科学,2013,32(9):509-515.
- [5] 王海霞,刘 瑀,关春江,等. 营养条件对微藻碳、氮稳定同位素组成的影响[J]. 中国环境科学,2014,34(3):727-733.
- [6] 吴玉霖,周成旭. 甲藻赤潮的海洋环境危害及其防治[J]. 海洋环境科学,1997,16(4):59-63.
- [7] 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.
- [8] GB/T 21805-2008,化学品 藻类生长抑制试验[S].
- [9] 刘 菱. 不同营养条件对赤潮藻碳和氮稳定同位素组成的影响[D]. 大连:大连海事大学,2012.
- [10] 赵 文. 水生生物学[M]. 北京:中国农业出版社,2005:515-518.
- [11] 国家海洋局 908 专项办公室. 海洋化学调查技术规程[M]. 北京:海洋出版社,2006.
- [12] 张水浸,许昆灿,陈其焕,等. 厦门西港区一次赤潮的观测[J]. 海洋学报,1988,10(5):602-608.
- [13] 宋秀凯,马建新,刘义豪,等. 隍城岛海域塔玛亚历山大藻赤潮发展过程及其成因[J]. 海洋湖沼通报,2009(4):93-98.
- [14] 侯建军,黄 辉,雷红灵,等. 厦门西海域裸甲藻和原甲藻赤潮的观察[J]. 中国水产科学,2007,14(6):950-959.
- [15] LUDWIG C A. The availability of different forms of nitrogen to a green alga [J]. American Journal of Botany, 1938, 25(6):448-458.
- [16] LIN Q F. Red tides investigation and study abroad[J]. Marine Environmental Science,1988,7(1):26-33.
- [17] COLLOS Y, G SLAWYK. Nitrogen uptake and assimilation by marine phytoplankton [J]. Primary Productivity in the Sea, 1980,19:195-211.
- [18] 包苑榆,钟 萍,韦桂峰,等. 基于 $^{15}\text{N}$ 稳定同位素技术的斜生栅藻对硝氮和氨氮吸收研究[J]. 水生态学杂志,2011,32(3):16-20.
- [19] BENTAL M, OREN-SHAMIR M, AVRON M, et al.  $^{31}\text{P}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR studies of the phosphorus and carbon metabolites in the halotolerant alga, *Dunaliella salina* [J]. Plant Physiology, 1988, 87(2):320-324.
- [20] BRUTEMARK A, LINDEHOFF E, GRANÉLI E, et al. Carbon isotope signature variability among cultured microalgae; Influence of species, nutrients and growth [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2009, 372(1/2):98-105.
- [21] BERDALET E, MARRASÉ C, ESTRADA M, et al. Microbial community responses to nitrogen-and phosphorus-deficient nutrient inputs; microplankton dynamics and biochemical characterization [J]. Journal of Plankton Research, 1996, 18(9):1627-1641.
- [22] PENNOCK J R, VELINSKY D J, LUDLAM J M, et al. Isotopic fractionation of ammonium and nitrate during uptake by *Skeletonema costatum*; Implications for  $\delta^{15}\text{N}$  dynamics under bloom conditions [J]. Limnology and Oceanography, 1996, 41(3):451-459.