

Alexandrium tamarense
Volume
Nutriments cellulaires

Alexandrium tamarense
Volume
Nutrient contents

Variations du volume et des quotas en N et P d'*Alexandrium tamarense* (*dinoflagellata*) en culture continue limitante en nitrate

Pierre MARSOT

Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-Océanologie, 310 allée des Ursulines, Rimouski, G5L 3A1, Québec, Canada.

Reçu le 13/12/95, révisé le 17/12/96, accepté le 07/01/97.

RÉSUMÉ

Une culture continue d'*Alexandrium tamarense*, limitante en NO_3^- , a été réalisée avec une agitation douce du milieu, obtenue par une aération et la révolution lente d'un barreau aimanté. Les concentrations intracellulaires des nutriments $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ et PO_4^{3-} et le volume du dinoflagellé ont été mesurés à des taux de dilution variant entre 0,05 et 0,37 d^{-1} . Les résultats montrent une relation positive entre le volume cellulaire et le taux de dilution. Le volume du dinoflagellé passe de 11 500 à 31 000 μm^3 . Les analyses indiquent également une interdépendance étroite du volume cellulaire et de son contenu en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$. Les quotas cellulaires en nutriments azotés augmentent avec la taille des cellules, de 0,09 à 1,1 pmol cell^{-1} . La relation positive qui existe entre le volume cellulaire, la concentration intracellulaire en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ et le taux de dilution est discutée en fonction de la prolifération du dinoflagellé dans son environnement naturel.

ABSTRACT

Variations in volume and nutrient (N and P) content of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in N-limited continuous culture.

N-limited continuous growth of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* was performed by applying soft mixing conditions to the culture medium by means of air bubbling and slow rotation of a stirring bar. The cellular nitrate + nitrite and phosphate content and cell volume of *Alexandrium tamarense* were measured at different dilution rates from 0.05 to 0.37 d^{-1} . Cell volume varied from 11 500 to 31 000 μm^3 between these extremes, indicating a significant positive correlation between cell volume and dilution rate. The analyses also reveal a strong interdependence of cell size and $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ cellular content, the latter increasing from 0.09 to 1.1 pmol cell^{-1} with increases in cell size. The positive relationship between cell size, $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ cell content and dilution rate is discussed in terms of the implication of such parameters in the proliferation of this dinoflagellate in a natural environment.

Oceanologica Acta, 1997, 20, 4, 639-643.

INTRODUCTION

Des variations importantes du volume cellulaire d'*Alexandrium* sp. ont été observées au cours de son cycle vital en culture confinée et *in situ* (Loeblich et Loeblich, 1975). Les résultats obtenus dans la littérature sur ce sujet

sont toutefois contradictoires et témoignent des conditions expérimentales différentes (Gartia-Martin et Casais-Laïno, 1991). Ainsi, les auteurs notent soit une augmentation, soit peu de variations du volume cellulaire avec l'âge de la culture (Prakash, 1967; Prakash *et al.*, 1973; White, 1978; Watras *et al.*, 1982). D'autres, au contraire, observent une

diminution du volume d'*Alexandrium* avec la baisse du taux de croissance (Boyer *et al.*, 1987; Boczar *et al.*, 1988).

Par ailleurs, une relation a été établie entre la taille des cellules et leur niveau de toxicité: les cellules les plus volumineuses étant les plus toxiques (Kodama *et al.*, 1982). Cette étude souligne l'importance du paramètre volume cellulaire dans la façon d'exprimer le degré de toxicité d'*Alexandrium* et pour estimer l'influence des facteurs environnementaux sur la biosynthèse des neurotoxines. En culture confinée par les NO_3^- , la concentration cellulaire des neurotoxines augmente durant la croissance et cette valeur s'accroît plus rapidement lorsqu'elle est exprimée par unité cellulaire que par volume cellulaire (Boyer *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1990a). Le paramètre volume peut ainsi contribuer pour près de 50 % du niveau de toxicité de l'algue. En milieu limité par les PO_4^{3-} , le volume d'*Alexandrium* varie peu (Anderson *et al.*, 1990a) et les fluctuations de toxicité exprimées en fonction du volume et de la croissance ont des valeurs comparables.

L'effet synergique de NO_3^- et de μ sur la synthèse des neurotoxines d'*Alexandrium* sp. a été confirmé en culture semi-continue limitante en nitrates, par une augmentation de la toxicité cellulaire avec le taux de dilution, ce dernier étant assimilable, dans ce travail, au taux de croissance (Anderson *et al.*, 1990b). Toutefois, ces observations ne tiennent pas compte des variations du volume cellulaire et, probablement à cause de la difficulté pour *Alexandrium* de croître en milieu fortement agité, on connaît peu les effets véritables du taux de dilution sur le volume et les quotas intracellulaires en nutriments de ce dinoflagellé. L'inhibition de la croissance résultant d'une agitation vigoureuse et constante du milieu rend pratiquement impossible l'opération d'une culture continue d'*Alexandrium* (Anderson *et al.*, 1990a). L'emploi d'un procédé d'agitation combinant bullage et révolution lente d'un barreau aimanté, nous permet de décrire dans ce travail les variations du volume cellulaire d'*Alexandrium tamarense* et de ses réserves en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ en relation avec le taux de dilution d'une culture limitée par les nitrates.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souche d'algue

L'algue utilisée pour cette étude est le dinoflagellé marin *Alexandrium tamarense*, autrefois nommé *Gonyaulax tamarensis*. La souche axénique (GT 429) provient de la collection du Bigelow Laboratory for Oceans Sciences (West Booth Bay Harbor, Maine, USA). L'algue est maintenue en culture statique avec le milieu enrichi f/2, de Guillard et Ryther (1962).

Culture continue

Le montage du système comporte une réserve de milieu reliée à une chambre de culture d'une capacité de 4 l contenant 3,5 l de culture. Une pompe péristaltique de faible débit (Gilson, Minipuls 2) installée entre la

nourrice et la chambre de culture, permet de fixer avec précision le taux de dilution (D). Le surplus de la culture se déverse par un trop-plein, vers un récipient de récolte, grâce à la pression positive résultant de l'aération de la culture. On sait qu'en culture continue, l'agitation du milieu est nécessaire pour assurer une diffusion rapide des nutriments et un rejet uniforme des cellules produites. L'homogénéisation de notre culture a donc été réalisée en considérant le fait que cette espèce prolifère mieux dans un milieu agité par aération que par révolution rapide d'un barreau (Siegelman et Kycia, 1979; Siegelman et Levandowski, 1985; observations personnelles). Conséquemment, l'agitation du milieu de culture fut assurée par l'action combinée d'un bullage à l'air stérile (440 ml min^{-1}), distribuée vers quatre diffuseurs, et la révolution lente (60 rpm) d'un barreau aimanté de 5 cm de longueur sur 1 cm de diamètre. La dispersion uniforme des cellules a été vérifiée en échantillonnant au hasard une culture d'*Alexandrium* d'une densité de $47 \times 10^6 \text{ cell. l}^{-1}$. L'écart-type des observations ($n=8$) s'est avéré inférieur à 5 %.

La culture continue était maintenue à une température constante de 17°C et exposée à une intensité d'éclairement de $150 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, assurée par des tubes fluorescents « cool-white », avec une photopériode de 14h/10h. Les prélèvements dans la chambre de culture avaient lieu à heure fixe, soit huit heures après le début de la phase éclairée. La culture est demeurée dans des conditions axéniques en stérilisant le milieu nourricier à l'autoclave. Le milieu limité par les NO_3^- a été préparé avec l'eau de l'estuaire du Saint-Laurent contenant $49,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$, à laquelle étaient ajoutés les autres nutriments (à l'exception des silicates) aux concentrations du milieu f/2. Le taux de croissance néperien (μ_e) est calculé en appliquant la formule :

$\mu_e = \ln(N_2/N_1)/(t_2-t_1) + D$, où N_1 et N_2 représentent les nombres de cellules aux temps t_1 et t_2 respectivement. Le taux de dilution (D) exprime, en d^{-1} , le rapport entre le débit journalier du milieu nourricier et le volume de la culture. Une concentration cellulaire initiale de $13 \times 10^6 \text{ cell. l}^{-1}$ a d'abord été obtenue en milieu enrichi. Quinze jours avant le début de l'expérience, le milieu f/2 fut éliminé par un apport constant de milieu limitant en NO_3^- au taux de dilution moyen de $0,75 \text{ d}^{-1}$. Le comportement d'*Alexandrium* a été observé aux taux de dilution de 0,05, 0,11, 0,15, 0,19, 0,31 et $0,37 \text{ d}^{-1}$ correspondant à des expositions respectives du dinoflagellé de 15, 10, 5, 8, 6 et 5 jours. Les échantillons ont été prélevés à la fin de chacune de ces périodes dont la durée est exprimée dans le tableau 1 en nombre de générations/jour ($\text{Nb générations} = \mu_e/\ln 2$).

Mesures cellulaires et analyse des nutriments

Le dénombrement des cellules était effectué à cinq reprises sur une lame à puits de type Palmer-Maloney. Le volume cellulaire était calculé à partir de la valeur moyenne des diamètres mesurés sur plus de 60 cellules, en assimilant les cellules à des sphères de diamètre équivalent. L'extraction des $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ était effectuée selon le protocole Q-1

de Thoresen *et al.* (1982) avec quelques modifications. Des volumes variant de 50 à 100 ml de culture étaient filtrés sur filtre GF/C (25 mm) sous un vide inférieur à 67 hPa. Le filtrat était conservé pour l'analyse des nutriments du milieu de culture. Le filtre et les cellules étaient rincés avec une solution isotonique de NaCl (suprapur, Merck, Co. Darmstadt, Allemagne) et plongés dans 5 ml d'eau déionisée bouillante. Les échantillons étaient congelés à -20°C jusqu'au moment de leur analyse. Les nutriments ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ et PO_4^{3-}) intracellulaires, du milieu de culture et du milieu nourricier furent analysés sur l'appareil Technicon Autoanalyser II selon le protocole décrit par Strickland et Parsons (1972). Les analyses étaient dupliquées et la variation analytique des répliqués s'est avérée en moyenne inférieure à 15 %.

RÉSULTATS

Le volume d'*Alexandrium tamarense* et son contenu cellulaire en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ et PO_4^{3-} sont présentés dans le tableau 1.

La durée d'exposition aux divers taux de dilution est généralement supérieure à une génération. Dans plusieurs cas, le taux de croissance népérien (μ_e) se rapproche des valeurs de D, signifiant ainsi un certain équilibre de croissance de la culture. Par contre, la densité cellulaire diminue rapidement avec l'augmentation de D et la baisse du rapport μ_e/D (0,23/0,37), observée après 2,6 générations, indique que la culture a déjà atteint son taux de croissance maximal au taux de dilution de 0,37 d^{-1} . Dans ces conditions, les pertes cellulaires pourraient conduire à l'extinction de la culture. D'autres auteurs ont obtenu avec *A. fundyense*, en culture semi-continue limitée en azote, un μ_e pouvant atteindre 0,38 d^{-1} (Anderson *et al.*, 1990a, 1990b). Le tableau 1 montre également de fortes concentrations résiduelles en NO_3^- du milieu de culture aux taux de dilution supérieurs à 0,3 d^{-1} .

Les concentrations cellulaires en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ augmentent substantiellement avec la hausse du taux de dilution, mais l'effet de D se révèle davantage lorsque les réserves

en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ d'*Alexandrium* sont exprimées par unité cellulaire plutôt qu'en volume (tableau 1). La teneur cellulaire de ces nutriments aux taux de dilution élevés (D=0,31 et 0,37) est de l'ordre de celle observée durant la croissance exponentielle de cette espèce en culture confinée, soit environ 0,7 pmol cell^{-1} (Thoresen *et al.*, 1982). Par ailleurs, les concentrations intracellulaires du nutriment non limitant PO_4^{3-} ne semblent pas être affectées par la hausse de D.

La figure 1 montre selon un modèle de régression simple, une relation significative ($r=0,982$, P (0,02) entre le volume cellulaire moyen d'*A. tamarense* (nombre total d'observations=395) et le taux de dilution de la culture limitée par les nitrates. L'augmentation du volume cellulaire est important : il varie entre 11 500 et 31 000 μm^3 pour un accroissement de D de 0,05 à 0,37 d^{-1} . Ce résultat nous amène à établir une autre relation significative ($r=0,97$) entre le contenu cellulaire du nutriment limitant NO_3^- et le volume moyen d'*A. tamarense* durant sa croissance en culture continue (fig. 2).

DISCUSSION

Nos observations montrent une interdépendance évidente du volume d'*A. tamarense* avec son contenu en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$. Les relations entre ces deux paramètres ont été étudiées surtout en regard des différences interspécifiques qui existent chez les micro-algues de diverses tailles. Dans ce contexte de recherche écologique, il semble généralement admis que la composition chimique et les quotas de subsistance en nutriments varient en relation avec le volume cellulaire de l'espèce (Shuter, 1978; Moal *et al.*, 1987). L'étude de ces paramètres et de leur corrélation au moyen de cultures monospécifiques limitées par les nitrates est rare, particulièrement chez les dinoflagellés, mais les résultats obtenus avec d'autres classes de micro-algues semblent appuyer nos observations. Ainsi, la diatomée *Thalassiosira pseudonana*, en culture continue limitante en NO_3^- , affiche ses plus grands volumes et réserves cellulaires en N et C aux forts taux de dilution

Tableau 1

Concentrations intracellulaires et extracellulaires des nutriments $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ et PO_4^{3-} d'une culture continue limitante en nitrate d'*Alexandrium tamarense* opérant à divers taux de dilution.

Cellular and extracellular concentrations of $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ and PO_4^{3-} nutrients in N-limited continuous culture of *Alexandrium tamarense* at different dilution rates.

D (d^{-1})	Nb. de Génération	μ_e (d^{-1})	Cell l^{-1} ($\cdot 10^{-6}$)	$\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ cellulaire		PO_4^{3-} cellulaire		$\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$		PO_4^{3-}	
				pmol cell^{-1}	mmol l^{-1}	pmol cell^{-1}	mmol l^{-1}	milieu	$\mu\text{mol l}^{-1}$	milieu	$\mu\text{mol l}^{-1}$
0,05	0,65	0,05	22,20	0,09	7,80	10,10	878,70	1,60		40,20	
0,11	1,60	0,08	5,11	0,20	17,00	12,60	1073,00	–		36,90	
0,15	1,10	0,15	4,06	0,35	19,00	10,70	623,62	0,58		–	
0,19	2,10	0,15	2,31	0,40	22,23	9,41	522,93	6,30		75,15	
0,31	2,60	0,32	1,09	0,63	23,90	13,65	543,42	27,52		91,23	
0,37	2,60	0,23	0,42	1,10	35,40	21,80	701,80	34,90		93,00	

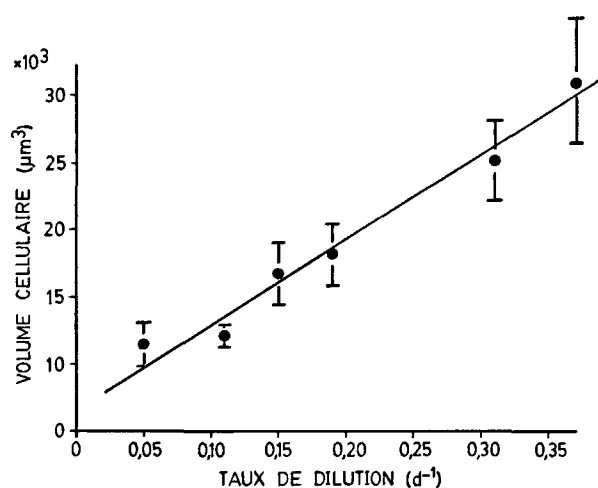


Figure 1

Droite de régression linéaire montrant la relation entre le volume cellulaire d'*Alexandrium tamarense* et le taux de dilution de la culture continue limitante en NO_3^- . Les lignes verticales indiquent l'écart-type de la moyenne des observations ($n > 60$).

Regression line showing the relationship between cell volume of *Alexandrium tamarense* and dilution rate of N-limited continuous culture. Vertical bars indicate means \pm SD ($n > 60$).

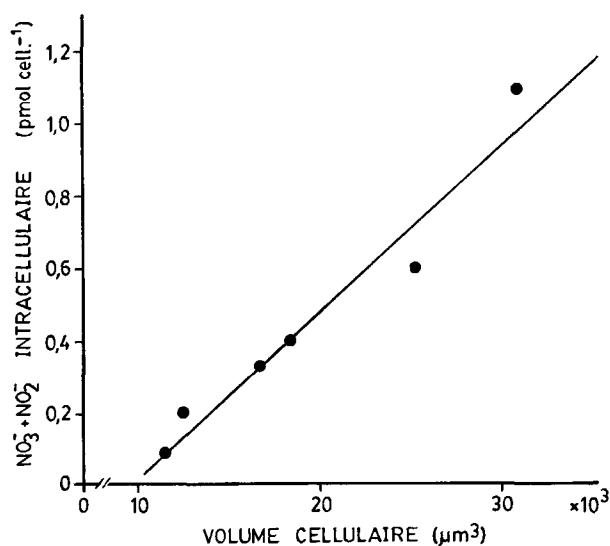


Figure 2

Droite de régression linéaire montrant la relation entre le volume cellulaire d'*Alexandrium tamarense* évoluant en culture continue limitante en NO_3^- , et son contenu cellulaire en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$.

Regression line showing the relationship between cell volume of *Alexandrium tamarense* in N-limited continuous culture and its $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ cellular content.

(Eppley et Renger, 1974). Par ailleurs, la relation entre le volume et les concentrations cellulaires en NO_3^- se révèle chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* en culture à dialyse exposée à un milieu naturel, par une baisse graduelle de volume cellulaire au fur et à mesure de l'épuisement des $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ du milieu de culture et de la baisse de μ (Marsot *et al.*, 1992). Dans la mesure où il existe une relation entre volume cellulaire et toxicité d'*Alexandrium* (Kodama *et al.*, 1982), les fortes variations du volume enregistrées en limitation de NO_3^- (près du

triple; fig. 1), soulignent l'importance de ce paramètre dans l'expression de la toxicité du dinoflagellé.

Nous pouvons également déduire de ces données une relation entre le volume et l'activité de croissance de l'algue pour autant qu'il existe un certain équilibre entre μ_e et D (tableau 1) et que le dinoflagellé maintienne un mode de reproduction végétative. La reproduction sexuée d'*Alexandrium* semble plutôt improbable sous nos conditions et ce, pour les raisons suivantes: premièrement, le faible pourcentage de cellules de volume supérieur à $42 \mu\text{m}^3$, témoignant chez cette espèce de la présence de planoméiocytes et de planozygotes (Anderson *et al.*, 1983). On observe en effet, aux taux de dilution de 0,05, 0,11, 0,15 et 0,19 d^{-1} moins de 1 % de cellules supérieures à $42 \mu\text{m}^3$. Ce pourcentage augmente à 8 et 9 % aux plus forts taux de dilution (0,31 et 0,37 d^{-1}). De plus, la transformation des cellules végétatives en gamètes fusionnées, incapables de se diviser (planozygotes), ne pourrait soutenir une croissance continue de l'algue sur plusieurs générations. Par ailleurs, les conditions d'une culture semi-continue limitante en NO_3^- ne semblent pas provoquer la reproduction sexuée d'*Alexandrium fundyense* (Anderson *et al.*, 1990a, 1990b). En culture confinée non limitante, on retrouve une relation inverse, entre les paramètres volume et croissance cellulaire, chez plusieurs espèces de micro-algues (Banse, 1982; Admiraal *et al.*, 1986; Thompson *et al.*, 1991) et plus spécifiquement chez *Alexandrium* (Watras *et al.*, 1982). L'ensemble de ces résultats nous amène donc à conclure que les relations positives entre les trois paramètres: volume, réserves cellulaires en $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ et taux de croissance (figs. 1, 2) sont surtout observables en milieu ouvert (culture continue) et ce, pour la raison principale que les activités métaboliques de l'algue (μ_e , quota de subsistance, etc.) sont déterminées par le taux d'approvisionnement du nutriment limitant, c'est-à-dire le taux de dilution (Droop, 1983). La relation entre μ et quota cellulaire d'un nutriment limitant a été démontrée chez plusieurs autres espèces phytoplanctoniques notamment la chrysophycée *Pavlova lutheri* envers la vitamine B12 (Droop, 1968) et le nitrate (Caperon et Meyer, 1972) et la diatomée *Thalassiosira pseudonana* envers le silicium (Paasche, 1973).

Les observations en culture continue permettent, dans une certaine mesure, de rapprocher le comportement du dinoflagellé et les conditions parfois limitantes du milieu naturel. On sait que la culture continue, en tant que système ouvert, s'apparente davantage aux conditions naturelles que la culture confinée (Rhee, 1980) et que le facteur débit d'eaux limitantes en NO_3^- s'applique également à un milieu estuarien ou côtier. Plusieurs études suggèrent en effet, que l'apparition de marées rouges est souvent associée au flux continu, relativement faible, d'un milieu enrichi en NO_3^- atteignant les zones de concentrations phytoplanctoniques épuisées en nitrates (Holmes *et al.*, 1967; Rensel, 1993). Le nutriment NO_3^- constituerait donc le principal élément limitant la formation d'eaux rouges. Cet apport de milieu nourricier permet d'alimenter directement les zones de prolifération phytoplanctoniques ou d'enrichir les régions plus profondes ($> 10 \text{ m}$) fréquentées par les dinoflagellés au cours de leur migration nocturne (Harrison, 1976).

Remerciements

Nous tenons à souligner l'assistance logistique du Dr. A.D. Cembella et des responsables du laboratoire de l'Institut Maurice Lamontagne de Mont-Joli (Québec).

Cette recherche a reçu l'appui financier du Ministère des Approvisionnements et Services et de Pêches et des Océans Canada. Nous remercions également le professeur J.P. Chanut pour la révision du manuscrit et l'analyse critique des résultats.

RÉFÉRENCES

- Admiraal W., H. Peletier, R.W.P.M. Laane (1986). Nitrogen metabolism of marine planktonic diatoms; excretion, assimilation and cellular pools of free amino acids in seven species with different cell size. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **98**, 241-263.
- Anderson D.M., S.W. Chisholm, C.J. Watras (1983). Importance of life cycle events in the population dynamics of *Gonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* **76**, 179-189.
- Anderson D.M., D.M. Kulis, J.J. Sullivan, S. Hall (1990a). Toxin composition variations in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Toxicon* **28**, 885-893.
- Anderson D.M., D.M. Kulis, J.J. Sullivan, S. Hall, C. Lee (1990b). Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellate *Alexandrium* spp. *Mar. Biol.* **104**, 511-524.
- Banse K. (1982). Cell volume, maximal growth rates of unicellular algae and ciliates, and the role of ciliates in the marine pelagial. *Limnol. Oceanogr.* **27**, 1059-1071.
- Boczar B.A., M.K. Beittler, J. Liston, J.J. Sullivan, R.A. Cattolico (1988). Paralytic shellfish toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture. *Plant Physiol.* **88**, 1285-1290.
- Boyer G.L., J.J. Sullivan, R.J. Andersen, P.J. Harrison, F.J.R. Taylor (1987). Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* **96**, 123-128.
- Caperon J., J. Meyer (1972). Nitrogen limited growth of marine phytoplankton I. Changes in population characteristics with steady-state growth rate. *Deep-Sea Res.* **19**, 601-618.
- Droop M.R. (1983). 25 years of algae growth kinetics. A personal view. *Bot. Mar.* **26**, 99-112.
- Droop M.R. (1968). Vitamin B₁₂ and marine ecology. IV: The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **48**, 689-733.
- Eppley R.W., E.H. Renger (1974). Nitrogen assimilation of oceanic diatom in nitrogen-limited continuous culture. *J. Phycol.* **10**, 15-23.
- Gartia-Martin M.S., C. Casais-Lano (1991). Effects of temperature and salinity on the dinoflagellate *Alexandrium lusitanicum*. I. Cell volume, cell concentrations in the culture and cellular composition. *Environ. Technol.* **12**, 999-1005.
- Guillard R.R.L., J.H. Ryther (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt), and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* **8**, 229-239.
- Harrison W.G. (1976). Nitrate metabolism of the red tide dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* Stein. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **21**, 199-209.
- Holmes R.W., P.M. Williams, R.W. Eppley (1967). Red water in La Jolla Bay, 1964-1966. *Limnol. Oceanogr.* **12**, 503-512.
- Kodama M., Y. Fukuyo, T. Igarashi, H. Kamaiya, F. Matsuura (1982). Comparison of toxicities of *Protogonyaulax* cells of various sizes. *Bull. Japan Soc. Sci. Foish.* **48**, 567-571.
- Loeblich L.A., A.R. Loeblich (1975). The organism causing New England red tides: *Gonyaulax excavata*. In: *Proceedings of the First International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms*, Locicero V.R. ed. Wakefield, Massachusetts: Mass. Sci. and Technol. Found., p. 207-224.
- Marsot P., K. Mouhri, A.D. Cembella (1992). Assimilation du nitrate en cycles diurnaux par *Phaeodactylum tricoratum*. *Plant. Physiol. Biochem.* **30**, 665-673.
- Moal J., V. Martin-Jézéquel, R.P. Harris, J.F. Samain, S.A. Poulet (1987). Interspecific and intraspecific variability of the chemical composition of marine phytoplankton. *Oceanologica Acta* **10**, 339-346.
- Paasche E. (1973). Silicon and the ecology of marine plankton diatoms. II: Silicate uptake kinetics in five diatoms species. *Mar. Biol.* **19**, 262-269.
- Prakash A. (1967). Growth and toxicity of a marine dinoflagellate, *Gonyaulax tamarensis*. *J. Fish. Res. Bd. Can.* (24), 1589-1606.
- Prakash A., L. Skoglund, B. Rystad, A. Jensen (1973). Growth and cell-size distribution of marine planktonic algae in batch and dialysis culture. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **30**, 143-155.
- Rensel J. (1993). Factors controlling paralytic shellfish poisoning (PSP) in Puget Sound, Washington. *J. Shellfish Res.* **12**, 371-376.
- Rhee G.Y. (1980). Continuous culture in phytoplankton ecology, In: *Advances in Aquatic Microbiology*; Droop M.R., Jannasch H.W., eds. Academic Press, N.Y., **2**, 151-203.
- Shuter B.J. (1978). Size dependence of phosphorus and nitrogen subsistence quotas in unicellular microorganisms. *Limnol. Oceanogr.* **23**, 1248-1255.
- Siegelman H.W., J.H. Kycia (1979). Large scale culture of dinoflagellate algae. In: *Proceedings of the Second International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms*. Taylor D.L., H.H. Seliger, C.M. Lemis eds. Elsevier, N.Y. North Holland, p. 115-120.
- Siegelman H., M. Levandowski (1985). Culturing of dinoflagellates. In: *Proceedings of the third International Conference on Toxic Dinoflagellates*, Anderson D.M., A.W. White, D.G. Baden, eds. N.B. St-Andrews, June 1985. Elsevier, N.Y. p. 471-472.
- Strickland J.D.H., T.R. Parsons (1972). A practical handbook of seawater analysis. *Fish. Res. Board Can.* J.C. Stevenson, ed. Ottawa.
- Thompson P.A., P.J. Harrison, J.S. Parslow (1991). Influence of irradiance on cell volume and carbon quota for ten species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* **27**, 351-360.
- Thoresen S.S., Q. Dortch, S.I. Amhed (1982). Comparison of methods for extracting intracellular pools of inorganic nitrogen from marine phytoplankton. *J. Plankt. Res.* **4**, 695-704.
- Watras C.J., S.W. Chisholm, D.M. Anderson (1982). Regulation of growth in an estuarine clone of *Gonyaulax tamarensis* Lebour: salinity-dependent temperature responses. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **62**, 25-37.
- White A.W. (1978). Salinity effects on growth and toxin content of *Gonyaulax excavata*, a marine dinoflagellate causing paralytic shellfish poisoning. *J. Phycol.* **14**, 474-479.