

# 有毒赤潮甲藻塔玛亚历山大藻 (香港株 II) 的生长特性研究

徐轶肖, 江天久\*, 吕颂辉

(暨南大学水生生态科学研究所, 广东 广州 510632)

**摘要:** 在室内条件下研究温度、N 和 P、维生素、抗生素对有毒赤潮甲藻塔玛亚历山大藻(香港株 II)生长的影响。结果表明,塔玛亚历山大藻的适宜生长温度和 N、P 浓度分别为 21–25°C, 882–1 765  $\mu\text{mol/L}$  和 18–72  $\mu\text{mol/L}$ 。复合维生素 B 的加入有利于塔玛亚历山大藻的生长,而 50 U  $\text{ml}^{-1}$  以上的抗生素则对其有明显的抑制作用。

**关键词:** 藻类;塔玛亚历山大藻;温度;氮;磷;维生素;抗生素

中图分类号:Q949.205

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2005)01-0021-04

## Studies on the Growth Characteristics of Toxic *Alexandrium tamarense* (Hong Kong Strain II)

XU Yi-xiao, JIANG Tian-jiu\*, LÜ Song-hui

(Institute of Aquatic Ecoscience, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** Effects of water temperature, nitrogen, phosphorus, vitamin and antibiotic on the growth of toxic *Alexandrium tamarense* (Hong Kong strain II) were studied under experimental conditions. Optimum growth temperature, N and P concentrations were 21–25°C, 882–1 765  $\mu\text{mol/L}$  and 18–72  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. Complex vitamin B was found to be beneficial for the algae growth, whereas over 50 U  $\text{ml}^{-1}$  antibiotic showed obvious inhibition effect.

**Key words:** Algae; *Alexandrium tamarense*; Temperature; Nitrogen; Phosphorus; Vitamin; Antibiotic

塔玛亚历山大藻是一种广布性的有毒赤潮甲藻,在大西洋、太平洋、北极、温带及热带都有,而在北半球的温带水域出现的频率最高,大多数麻痹性中毒事件与之密切相关<sup>[1]</sup>。已有资料显示,同种藻类不同藻株间的生长特性及毒素成分等存在一定差异。江天久等研究过塔玛亚历山大藻大鹏湾株的生长特性<sup>[2]</sup>,近期又在邻近大鹏湾的香港海域获得塔玛亚历山大藻香港株 II。本文探讨不同环境下塔玛亚历山大藻香港株 II 的生长规律,并比较两株生长特性的差异,为该藻株批量培养,制备麻痹性毒素提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

在 1998 年 4–5 月间,香港海域发生了大面积赤潮,本实验藻种(*Alexandrium tamarense*)即从该次赤潮中分离所得(编号 ATHK02)。该藻细胞大小为  $38.7 \pm 8.0 \mu\text{m} \times 38.8 \pm 8.6 \mu\text{m}$ ,通常以单细胞存在,对数生长期多由 2–3 个细胞构成链状体。该藻种自分离后,处在温度 20–23°C、光照强度 4 000 lx、光暗周期为 14:10 的培养条件下,培养液为 f/2 的改良配方。

收稿日期:2004-06-03 接受日期:2004-08-16

基金项目:暨南大学团队基金项目;国家重点基础研究发展规划(973)项目(2001CB409704);国家重点基础研究发展规划(973)项目(2001CB409709)联合资助

\* 通讯作者 Corresponding author

## 1.2 方法

实验前进行驯化培养, 将处于对数生长期的藻细胞接种于培养液内, 并在与实验设定的相同环境条件下驯化培养 2-3 d。实验在光照培养箱(广东省医疗器械厂, LRH-150G)内进行。实验时, 在 250 ml 三角瓶内盛 150 ml 实验培养液, 接种一定量的驯化培养物于瓶内, 使培养液内细胞浓度为  $400 \text{ cells ml}^{-1}$ 。将盛培养液的三角锥形瓶置于回旋振荡器上振荡 10 s, 取 0.1 ml 培养物用鲁哥氏液固定后在显微镜下计数, 重复 3 次, 计数值间相差应小于 15%, 取两个相近数据平均值为实验结果。每组实验设 3 个重复, 隔天取样。

温度设置 18、21、25 和  $28^\circ\text{C}$  4 组实验。

氮、磷浓度的设定以 Guillard 的 *f/2* 培养液配方为基础, 用  $\text{NaNO}_3$  调节培养液中氮浓度分别为 0、441、882、1765、3529、7059  $\mu\text{mol/L}$ , 用  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  调节培养液中磷浓度分别为 0、18、36、72、145、290  $\mu\text{mol/L}$ 。实验置于  $21^\circ\text{C}$  恒温下培养。

维生素浓度的设定以 Guillard 的 *f/2* 培养液配方为基础, 加入一定量的维生素(广州光华药业股份有限公司生产)母液, 使培养液中第一组维生素  $\text{B}_1$ 、 $\text{B}_6$ 、 $\text{B}_{12}$  浓度分别为 125、125、0.25  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 第二组分别为 250、250、0.50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 第三组分别为 500、500、1.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 以不含维生素为对照。

抗生素为氨苄青霉素(华北制药股份有限公司生产)液体, 在人工海水配制的 *f/2* 培养液中分别加入一定量的抗生素, 使培养液中抗生素含量分别为 0、50、100、200  $\text{U ml}^{-1}$  (160 万单位含氨苄青霉素 1.0 g)。实验在  $21^\circ\text{C}$  恒温下进行。

塔玛亚力山大藻对数期相对增长率由  $K = (\ln N_t - \ln N_0) / T$  计算, 其中  $K$  表示相对增长率;  $N_0$  为

藻细胞起始密度;  $N_t$  为培养  $T$  时间后的藻细胞密度;  $T$  为培养时间。

## 2 结果和分析

### 2.1 温度对塔玛亚历山大藻生长的影响

塔玛亚历山大藻在温度  $18\text{--}28^\circ\text{C}$  范围内均能较好地生长(图 1)。在  $21^\circ\text{C}$  时其相对增长率最大, 为  $0.21 \text{ d}^{-1}$ , 最大细胞密度为  $1.3 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$  时相对增长率为  $0.20 \text{ d}^{-1}$ , 最大细胞密度为  $1.7 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$ , 其适宜生长温度为  $21\text{--}25^\circ\text{C}$ 。接种 17-19 d 后藻细胞达最大生长密度。按照微藻生态学分类, 在温度  $10\text{--}35^\circ\text{C}$  内可良好生长的种类为中温性藻株, 本实验藻株属中温株, 适宜生长温度比邻近海域的大鹏湾株、大亚湾株略高<sup>[2,3]</sup>。

### 2.2 氮、磷对生长的影响

图 2 显示塔玛亚历山大藻在  $1765 \mu\text{mol/L}$  N 下藻细胞生长最快, 相对增长率为  $0.28 \text{ d}^{-1}$ , 小于此浓度, 生长率随浓度增加而升高, 超过此浓度, 生长率随浓度的增加而降低, 可能由于过量的硝酸盐改变了 N:P 比, 从而影响了藻细胞对 N、P 的吸收。石岩峻等发现塔玛亚历山大藻(由中国科学院海洋研究所提供)在高氮( $2646 \mu\text{mol/L}$ )条件下生长缓慢, 中氮( $882 \mu\text{mol/L}$ )时稳定期生物量最高<sup>[4]</sup>。Wang 对分离于南中国海的 *A. tamarensis* CI01 在不同 N 浓度下的生长研究表明, 在  $0\text{--}880 \mu\text{mol/L}$  范围内, 随 N 浓度的升高, 藻类密度增大<sup>[5]</sup>。本文的结果与他们的相符。因此, 在对本实验藻株进行批量培养时, 将 *f/2* 培养液配方中的 N 浓度由  $882 \mu\text{mol/L}$  提高至  $1765 \mu\text{mol/L}$  左右为佳。林昱等人的围隔实验证实, 培养 56 d 后尽管硝酸盐浓度在  $0.5 \mu\text{mol/L}$  以下,

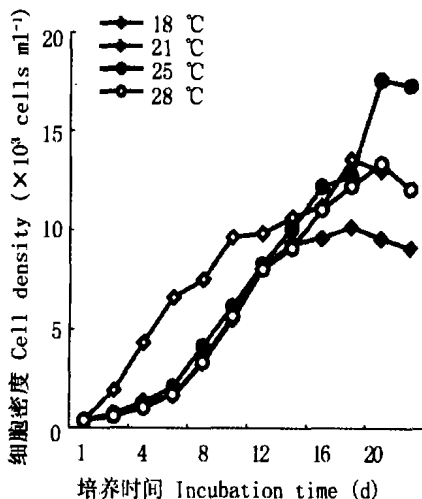


图 1 *A. tamarensis* 在不同温度下的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *A. tamarensis* at different temperatures

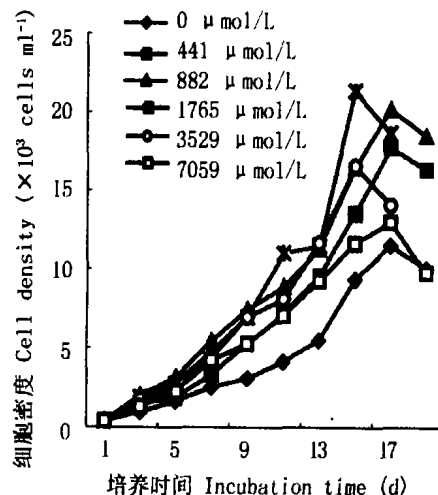


图 2 *A. tamarensis* 在不同氮浓度下的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of *A. tamarensis* at different nitrate concentrations

但 66 d 时海洋原甲藻数量仍达到最大密度  $5.0 \times 10^7$  cells  $L^{-1}$ , 且赤潮过程持续了 20 d 直至实验结束; 裸甲藻增殖前 10 d, 无机 N 浓度在  $21\text{--}28 \mu\text{mol/L}$  之间, 而在增殖过程中无机 N 浓度低于  $20 \mu\text{mol/L}$ <sup>[9]</sup>, 这说明甲藻增殖时对水体中氮营养盐浓度的要求并不苛刻, 但增殖前需要有一定量的营养盐供给。在本实验中, 培养液中不含 N, 塔玛亚历山大藻在 17 d 内仍会持续生长, 其原因可能有: (1) 接种时引入了一定量的 N 源, 且实验配制的人工海水中难以保证绝对不含 N; (2) 水体中无机 N 供给充足时藻细胞可能会积蓄 N 源供细胞分裂时使用; (3) 藻细胞分裂时对 N 的需求不是很高。这尚待进一步研究。

图 3 显示塔玛亚历山大藻对可溶性 P 有较广的适应性, 其适宜 P 浓度为  $18\text{--}72 \mu\text{mol/L}$ 。当 P 浓度为  $72 \mu\text{mol/L}$  时, 该藻出现最大相对增长率  $0.28 \text{d}^{-1}$ , 细胞密度达  $2.1 \times 10^4$  cells  $ml^{-1}$ 。与 N 的影响相似, 过量的 P (超过  $72 \mu\text{mol/L}$ ) 对藻细胞的生长产生抑制作用。张宜辉等对分离于厦门海区的 *A. tamarensis* 的研究表明, 无机 P 对其增殖的最适浓度为  $4.0\text{--}4.5 \mu\text{mol/L}$ , 低于这个浓度, 随浓度的增加藻细胞数迅速增加; 高于  $5.0 \mu\text{mol/L}$ , 藻细胞生长受抑制<sup>[7]</sup>。可见 P 对此两藻株的作用规律一致, 但最适浓度相差 4.5–16 倍, 这可能是藻株间差异所致。Wang 等人对采自大鹏湾的 *A. tamarensis* CI01 株的研究表明, P 浓度为  $0\text{--}40 \mu\text{mol/L}$ , 藻类生物量随 P 浓度的增加而增加<sup>[9]</sup>, 与本文结果基本一致, 这可能与两藻株的生长环境差别较小有关。当培养液中不含 P, 接种后 17 d 塔玛亚历山大藻仍能持续生长, 其原因可能是: (1) 同 N 一样, 接种时培养液中有一定量的 P 残留; (2) 较无机 P 而言, 甲藻倾向于累积有机 P<sup>[9]</sup>, 在无机 P 浓度低时, 塔玛亚历山大藻以体内储存

的有机 P 维持生长; (3) 甲藻生长时对 P 要求不高, 低 P (如  $0.3 \mu\text{mol/L}$ ) 是赤潮发生时限制其他藻类如硅藻的生长而形成甲藻赤潮的一种特有现象<sup>[9]</sup>。

### 2.3 维生素和抗生素的影响

由图 4 可见, 实验组塔玛亚历山大藻的生长要较对照组的好, 复合维生素 B 对其有促进作用。当  $B_1$ 、 $B_6$ 、 $B_{12}$  浓度为  $500$ 、 $500$ 、 $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$  时, 有最大相对增长率  $0.26 \text{d}^{-1}$ , 最大细胞密度  $2.6 \times 10^4$  cells  $ml^{-1}$ 。王正方等人的研究表明,  $B_1$ 、 $B_{12}$  和生物素能单独或者协同促进藻细胞的增殖, 其中以  $B_1$  和生物素的组合效应最强<sup>[10]</sup>。日本学者岩崎报道, 链状亚历山大藻 (*A. catenella*) 的增殖几乎都需要维生素 B, 而 Lwasaki 认为, *A. catenella* 对 B 族维生素的要求其实只是对  $B_{12}$  的要求<sup>[11]</sup>。本文只做了 3 种维生素的等比增量实验, 难以说明各单一成分及各成分间的交互作用对塔玛亚历山大藻生长的影响, 但复合维生素 B 明显有利于塔玛亚历山大藻的生长。事实上, 微藻对维生素 B 的需求差异很大, 有的藻类自身能产生维生素 B, 而许多甲藻则需要  $B_{12}$ <sup>[12]</sup>。海水中的维生素 B 含量很低, 通常在  $10 \times 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$  以下<sup>[13]</sup>, 因此在大量培养塔玛亚历山大藻时, 应在培养基中添加较充足的维生素 B。

在利用有毒藻提取毒素时, 需大规模培养藻类, 为了防止大量培养时细菌的污染, 常采用在培养液中加入抗生素的方法。在本实验中, 加入抗生素后塔玛亚历山大藻的生长明显受到抑制 (图 5)。随着抗生素浓度的升高, 藻细胞的生长明显减慢。对照组最大相对增长率为  $0.24 \text{d}^{-1}$ , 最大密度达  $2.0 \times 10^4$  cells  $ml^{-1}$ , 而实验组最大相对增长率为  $0.18\text{--}0.20 \text{d}^{-1}$ , 最大密度为  $0.7\text{--}1.4 \times 10^4$  cells  $ml^{-1}$ 。此外, 抗

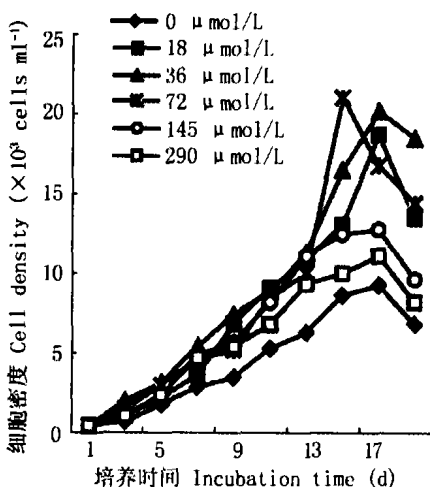


图 3 *A. tamarensis* 在不同磷浓度下的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of *A. tamarensis* at different phosphate concentrations

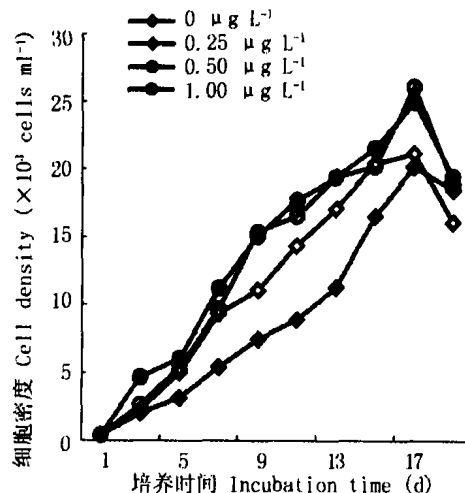


图 4 *A. tamarensis* 在不同复合维生素 B 浓度下的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of *A. tamarensis* at different incorporating vitamin B concentrations

生素浓度增加,细胞生长的衰退期提早出现,高抗生素浓度组的藻细胞在接种 17 d 后,数量即迅速下降。因此,大量培养该藻时,应严格控制抗生素氨基青霉素的加入量。Wang 的实验证实,100 U ml<sup>-1</sup> 抗生素可以促进 *A. tamarensis* CI01 的生长,并提高其毒素含量水平,当浓度为 1 000 U ml<sup>-1</sup> 时,藻类生长受抑制并最终死亡<sup>[4]</sup>。本实验藻株在青霉素浓度为 50 U ml<sup>-1</sup> 时生长即受抑制,随着浓度的增加,抑制现象愈明显。这可能是香港株 II 较南中国海株对青霉素更敏感。另外,抗生素常用来作为筛选海洋微藻基因工程的选择标记, *Amp<sup>r</sup>* 抗性基因能编码使β-内酰胺环水解的酶,从而使转化子解除氨基青霉素的毒性<sup>[5]</sup>。依据不同抗生素浓度下塔玛亚历山大藻(香港株 II) 96 h 的半有效浓度为 164 mg L<sup>-1</sup>。与黄健等<sup>[15]</sup>的结果比较,该藻对氨基青霉素十分敏感, *Amp<sup>r</sup>* 基因可能为塔玛亚历山大藻转基因工程的选择标记基因。

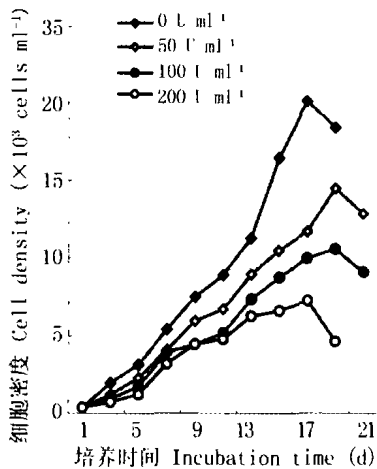


图 5 *A. tamarensis* 在不同抗生素浓度下的生长曲线

Fig. 5 Growth curves of *A. tamarensis* at different antibiotic concentrations

在本实验中还观察到所有加抗生素的培养液中出现一种小细胞的藻体,外部形态与一般细胞相似,但细胞较小,大小仅为  $23.05 \pm 2.02 \mu\text{m} \times 23.50 \pm 3.11 \mu\text{m}$ ,随抗生素浓度的增加,小细胞所占总数的比例亦上升,实验后期这种比例也越来越高,这与光亮裸甲藻在寡盐条件下培养出现小细胞的情况类似<sup>[6]</sup>,小细胞形成的生理学机理尚不清楚。

## 参考文献

- [1] Lehane L. Paralytic Shellfish Poisoning: A Review [M]. Australia: National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry, 2000. 26–34.
- [2] Jiang T J(江天久), Huang W J(黄伟建), Wang Z H(王朝晖), et al. Effects of water temperature, salinity and pH on growth and toxicity of *Alexandrium tamarensis* (Lebour) Balech (Dapeng Strain) [J]. Chin J Appl Envir Biol(应用与环境生物学报), 2000, 6(2):151–154.(in Chinese)
- [3] Yan T(颜天), Zhou M J(周名江), Qian P Y(钱培元). Study on the combined effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* [J]. Acta Oceanol Sin(海洋学报), 2002, 24(2):114–120.(in Chinese)
- [4] Shi Y J(石岩峻), Hu H H(胡晗华), Ma R Y(马润宇), et al. Nitrogen and phosphorus absorption and growth characteristics of *Alexandrium tamarensis* [J]. Chin J Appl Ecol (应用生态学报), 2003, 14(7):1143–1146.(in Chinese)
- [5] Wang D Z, Hsieh D P H. Effects of nitrate and phosphate on growth and C<sub>2</sub> toxin productivity of *Alexandrium tamarensis* CI01 in culture [J]. Marine Poll Bull, 2002, 45:286–289.
- [6] Lin Y, Lin R C. Research on red tide occurrence using enclosed experimental ecosystem in west Xiamen Harbor, China — relationship between nutrients and red tide occurrence [J]. Oceanol Limnol Sin, 2000, 18(3):253–259.
- [7] Zhang Y H(张宜辉), Lian Y W(连玉武). Effects of phosphorus on the growth of the red tide organism *Alexandrium tamarensis* [J]. Marine Envir Sci(海洋环境科学), 1999, 18(4):24–27.(in Chinese)
- [8] Yamamoto T. The seto inland sea-eutrophic or oligotrophic? [J] Marine Poll Bull, 2003, 47:37–42.
- [9] Li R X(李瑞香), Zhu M Y(朱明远), Wang Z L(王宗灵), et al. Mesocosm experiment on competition between two HAB species in East China Sea [J]. Chin J Appl Ecol(应用生态学报), 2003, 14(7):1049–1054.(in Chinese)
- [10] Wang Z F(王正方), Zhang Q(张庆), Lu Y(卢勇), et al. The effects of nutrients, vitamins and trace metals on the growth of the red tide organism *Prorocentrum micans* [J]. Donghai Marine Sci (东海海洋), 1996, 14(3):33–38.(in Chinese).
- [11] 游祖持. 译. B 族维生素对有毒涡鞭藻的影响 [J]. 水产科技情报, 2002, 29(6):272.
- [12] Lin Y(林昱), Zhuang D F(庄栋法), Chen X L(陈孝麟), et al. Effects of vitamin B<sub>12</sub> on phytoplanktonic community in marine enclosure ecosystem [J]. Ocean Taiwan Strait(台湾海峡), 1994, 13(1):32–36.(in Chinese)
- [13] Xie J M(谢镜明), Mai Z Q(麦志勤), Zhang Z X(张展霞), et al. Preliminary analysis of the vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>12</sub> concentrations for Shenzhen Bay and Dapeng Bay [J]. Oceanol Limnol Sin(海洋与湖沼), 1994, 25(2):185–189.(in Chinese)
- [14] Wang C H, Wang Y Y, Sun Y Y, et al. Effect of antibiotic treatment on toxin production by *Alexandrium tamarensis* [J]. Biomed Envir Sci, 2003, 16:340–347.
- [15] Huang J(黄健), Tang X X(唐学玺), Gong X Z(宫相忠), et al. Selective marker of marine genetic engineering [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 2000, 42(8):841–844.(in Chinese)
- [16] Lin Y S(林元烧). Studies on the growth characters of a marine dinoflagellate, *Gymnodinium splendens* Lebour [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci)(厦门大学学报自然科学版), 1994, 33(4):525–531.(in Chinese)