塔玛亚历山大藻的生长研究

江天久[1]　徐轶肖[2]
(1. 暨南大学环境工程系, 广州　510632; 2. 温州医学院海洋科学系, 温州　325035)

摘要: 在室内条件下研究了温度、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㊣)生长的影响。结果表明, 塔玛亚历山大藻的最适生长温度为 21—25℃, 最适 N、P 浓度分别为 882—1765μmol/L 和 18—72μmol/L。复合维生素 B_1、B_6、B_{12}的加入有利于塔玛亚历山大藻的生长, 而 50U/mL 以上的抗生素(氨苄青霉素液体)则对其有明显的抑制作用。

关键词: 塔玛亚历山大藻; 温度; 营养盐浓度; 维生素; 抗生素
中图分类号: X171.5　　文献标识码: A　　文章编号: 1000-3207(2006)04-0472-05

塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense* Balech)是一种广布性的有毒赤潮甲藻, 在大西洋、太平洋、北极、温带及热带都有出现, 而以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[1,2]。已有资料显示, 在同种藻类的不同藻株间, 生长特性及毒素成分等方面存在一定差异。笔者此前已研究过塔玛亚历山大藻大鹏湾株的生长特性[3], 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㊣, 本文探讨了不同环境下塔玛亚历山大藻香港株㊣的生长, 以此比较两株间存在的差异, 并为该藻株批量培养, 制备麻痹性毒素提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料　在 1998 年 4—5 月间, 香港海域发生了大面积赤潮, 本实验藻种即从该次赤潮中分离所得(编号 ATHK02)。该藻细胞大小为 38.7(±8.0)μm × 38.8(±8.6)μm, 通常以单细胞形态存在, 处对数生长期时, 则多为由 2—3 个细胞构成的链状体。该藻种自分离出后, 置于 20—23℃, E = 4000lx, 光周期 L□D= 14□10, 培养液为 F/2 改良配方(未加 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、$CoCl_2 \cdot 6H_2O$、$MnCl_2 \cdot 4H_2O$、$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$、维生素 B_1、B_{12}和生物素)的条件下进行培养。

1.2　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—3d。实验在光照培养箱内进行。在 250mL 三角瓶内盛 150mL 培养液, 接种一定量的驯化培养物, 使培养液内细胞浓度为 400cells/mL。每组实验设 3 个重复, 隔天取样。取样时, 将盛培养液的三角锥形瓶置于回旋振荡器上振荡 10s, 取 0.1mL 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%, 取两相近数据平均值为实验结果。由于香港最高气温在 7 月, 平均达 28.3℃, 最低气温在 1 月, 平均 14.3℃, 年平均气温为 22.5℃, 所以选取 18、21、25℃和 28℃作为实验温度。

1.3　氮、磷浓度的设定　用修改后的 B 液配方配制人工海水, 以 Guillard 的 F/2 培养液配方为基础, 用硝酸盐溶液调节培养液中氮浓度分别为 0、441、882、1765、3529、7059μmol/L, 用磷酸盐溶液调节培养液中磷浓度分别为 0、18、36、72、145、290μmol/L。实验时, 接种一定量驯化的藻种, 并置于 21℃恒温条件下培养。

1.4　维生素浓度及抗生素浓度设定　维生素来源于广州光华药业股份有限公司, 在人工海水配制的培养液中分别加入一定量的维生素母液, 使培养液中第一组维生素 B_1、B_6、B_{12}浓度分别为 125、125、

收稿日期: 2005-06-08; 修订日期: 2006-01-20
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); 暨南大学团队基金项目资助
作者简介: 江天久(1964—), 男, 湖北麻城人, 教授, 主要从事水污染生态和海洋生物毒素的研究和教学。E-mail: tjiangtj@jnu.edu.cn

0.25μg/L, 第二组维生素 B_1、B_6、B_{12}浓度分别为 250、250、0.50μg/L, 第三组维生素 B_1、B_6、B_{12}浓度分别为 500、500、1.0μg/L, 设立一对照组。抗生素为华北制药股份有限公司生产的氨苄青霉素液体, 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、200U/mL (160 万单位含氨苄青霉素 1.0g)。实验时, 接种一定量驯化的藻种, 在 21℃恒温条件下培养。

1.5 相对增长率计算　对数期相对增长率由下式计算: $K=(\ln N_t-\ln N_0)/T$, 其中 K 表示相对增长率; N_0, 藻细胞起始浓度; N_t, 培养 T 时间后的藻细胞浓度; T, 培养时间。

2 结果与讨论

2.1 温度对塔玛亚历山大藻的作用

塔玛亚历山大藻在温度 18—28℃范围内均能较好的生长(图 1)。该藻在 21℃时有最大相对增长率 0.21d^{-1}, 在培养至 18d 时出现最高细胞浓度 1.3×10^4cells/mL, 25℃时相对增长率为 0.20d^{-1}, 在培养至 22d 时出现最高细胞浓度 1.7×10^4cells/mL, 其最适生长温度为 21—25℃。藻细胞在接种 17—22d 后达最高生长浓度。按照微藻生态学分类, 在温度 10—35℃内可良好生长的种类为中温性藻株, 本藻株属中温株, 比邻近海域大鹏湾株、大亚湾株温度略高[3,4]。

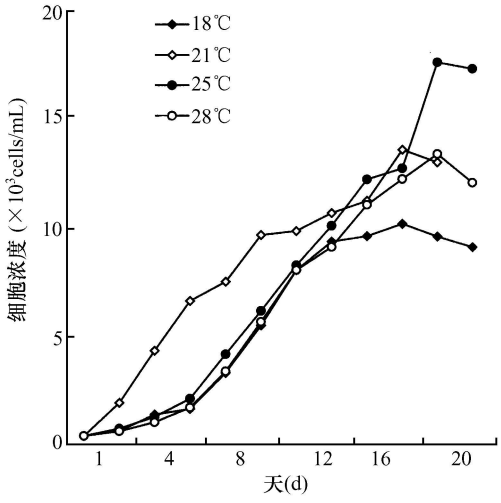


图 1　*A. tamarense* 在不同温度下的生长曲线

Fig. 1　Growth curves of *A. tamarense* under different temperatures

2.2 塔玛亚历山大藻在不同氮、磷浓度条件下的生长

图 2 显示塔玛亚历山大藻(香港株㊣)在实验设计 N 浓度范围内均可生长, N 浓度为 1765μmol/L 时, 藻细胞生长最快, 有相对增长率 0.28d^{-1}, 当培养液 N 浓度小于 1765μmol/L 时, 塔玛藻的生长率随 N 浓度增加而升高, 当 N 浓度超过 1765μmol/L 后, 塔玛藻的生长率随 N 浓度的增加而降低, 可见过量的硝酸盐对藻类的生长会产生毒害作用, 故其快速生长的最适 N 浓度应为 882—1765μmol/L。石岩峻等发现塔玛亚历山大藻在高氮 2646μmol/L 条件下生长缓慢, 中氮 882μmol/L 时稳定期生物量最高[5]。Wang 对分离于南中国海的 *A. tamarense* CI01 在不同氮浓度下的生长研究表明, 在 0—880μmol/L 范围内, 随 N 浓度的升高, 藻类密度增大[6]。上述趋势与本文相符。因此, 本藻株进行批量培养时, 应将 F/2 培养液配方中的 N 浓度 882μmol/L 提高至 1765μmol/L 左右为佳。林昱等人的围隔实验证实, 在 56d 以后尽管硝酸盐浓度水平在 0.5μmol/L 以下, 但海洋原甲藻数量在 66d 时仍达到最高密度 5.0×10^7cells/L, 且赤潮过程持续了 20d 直至实验结束; 裸甲藻增殖前 10d, 无机氮浓度在 21—28μmol/L 之间, 而在增殖过程中无机氮浓度低于 20μmol/L[7], 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。本研究中, 当 N 浓度为 0μmol/L 时, 塔玛亚历山大藻仍会在 17d 内持续生长, 其原因可能有三: (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氮; (2) 塔玛亚历山大藻细胞在水体中无机氮供给充足时可能会积蓄 N 源供细胞分裂时使用; (3) 塔玛藻细胞分裂时对 N 的需求可能不是很高。甲藻在低无机氮浓度时的生长机理尚待进一步研究。

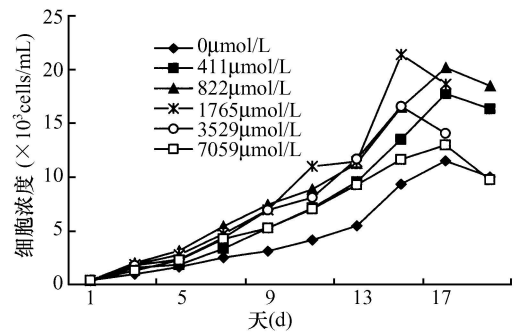


图 2　*A. tamarense* 在不同氮浓度下的生长曲线

Fig. 2　Growth curves of *A. tamarense* under different nitrate concentrations

图 3 显示塔玛亚历山大藻有较广的适应性, 各个浓度梯度内均可生长, 最适可溶性 P 浓度为 18—72μmol/L。当磷浓度为 72μmol/L 时, 该藻出现最大

相对增长率 0.28d^{-1}, 细胞密度达 2.1×10^{4}cells/mL。与氮对塔玛亚历山大藻生长的影响一样, 过量的磷浓度(超过 72μmol/L) 对藻细胞的生长也产生抑制作用。张宜辉等对分离于厦门海区的 *A. tamarense* 研究表明, 无机磷对其增殖的最适浓度为 4.0—4.5μmol/L, 低于这个浓度时, 随 P 浓度的增大, 藻细胞迅速增殖, 当高于 5.0μmol/L, 藻细胞生长受抑制[8]。磷对此两株的作用规律一致, 但最适浓度相差4.5—16 倍, 可能系藻株间差异所致。Wang 等人用采自大鹏湾的 *A. tamarense* CI01 株的研究表明, 在P 浓度为 0—40μmol/L 时, 藻类生物量随 P 浓度的增加而增加[6], 与本文结果基本一致, 这可能与两藻株的生长海区环境差别较小有关。当 P 浓度为 0 时, 塔玛藻在接种后 17d 内仍能持续生长, 其原因可能如下: (1) 同 N 一样, 接种时培养液中有一定量的 P 残留; (2) 较无机磷而言, 甲藻倾向于累积有机磷[9], 在无机磷浓度低时, 塔玛藻以体内储存的有机磷维持生长; (3) 甲藻生长时对 P 要求不高, 低 P(如 0.3μmol/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[10]。

冷科明等对深圳海域近 20 年赤潮发生特征的研究表明, 深圳近海引发赤潮的生物种类以甲藻为主(占赤潮引发种类的42.5%), 且由甲藻引发的赤潮大多有持续时间较长, 发生范围较广的现象[11]。本文证明了塔玛亚历山大藻低营养需求的特点, 从营养学的角度可部分解释上述现象, 当然, 深圳海域的主要赤潮甲藻种类是否都存在低营养的特点, 赤潮甲藻与硅藻间营养竞争的关系如何, 尚待进一步研究。

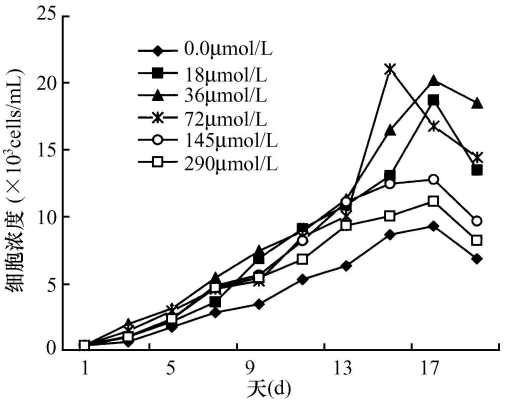


图3 *A. tamarense* 在不同磷浓度下的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of *A. tamarense* under different phosphate concentrations

2.3 塔玛藻对维生素及抗生素的响应

塔玛亚历山大藻在添加了复合维生素 B 的培养液中生长良好(图 4), 其生长率随维生素 B 浓度增加而增加, 因此复合维生素 B 对塔玛亚历山大藻的生长有促进作用。当 B_1、B_6、B_{12}浓度为 500、500、1.0μg/L 时, 最大生长率为 0.26d^{-1}, 最大细胞密度为 2.6×10^{4}cells/mL。王正方等人在研究海洋原甲藻的生长与维生素及生物素间的关系时发现, B_1、B_{12}和生物素能单独或者协同对藻细胞的增殖起促进作用, 其中以 B_1 和生物素的组合效应最强[12]。日本学者岩崎曾经报道, 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[13]。本研究只做了 3 种维生素成分的等比增量实验, 难以说明各单一成分及各成分间的交互作用对塔玛藻生长的影响, 但十分明显是塔玛藻的生长率与复合维生素 B 的增加呈正相关。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}[14]。海水中的维生素 B 含量很低, 通常在 10×10^{-3}μg/L 以下[15], 因此在塔玛亚历山大藻大量培养时, 应在培养基中添加较充足的维生素 B。

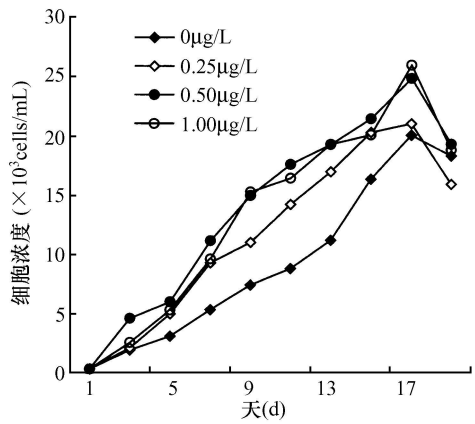


图 4 *A. tamarense* 在不同复合维生素 B 浓度下的生长曲线(以B_{12}为参照)

Fig. 4 Growth curves of *A. tamarense* under different incorporated vitamin B concentrations(B_{12} taken as reference)

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。在本实验中发现, 加入抗生素后塔玛亚历山大藻的生长明显受到抑制(图 5)。由图 5 可知, 随着抗生素浓度的升高, 藻细胞的生长明显减慢, 在相同的培养条件下, 不加抗生素的对照组最大相对增长率为 0.24d^{-1}, 最高密度达 2.0×10^{4}cells/mL, 而加抗生素的最大相对增长率为0.20—0.18d^{-1},

最高密度为 1.4—0.7 × 10^4cells/mL。此外, 随着抗生素浓度增加, 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培养 17d 后, 数量即迅速下降。因此, 大量培养该藻时, 对抗生素氨苄青霉素的加入量应严格控制。WANG 对 *A. tamarense* CI01 的抗生素(青霉素和链霉素的混合物) 实验中证实, 抗生素浓度 100U/mL 可以促进藻类的生长, 并提高其毒素含量水平, 当抗生素浓度为 1000U/mL 时, 藻类生长受抑制并最终死亡[16]。本实验藻株在青霉素浓度为 50U/mL 时生长即受抑制, 随着浓度的增大, 抑制现象逾明显。分析可能因香港株㊣较南中国海株对青霉素更敏感之故, 至于对其促进作用, 可以在青霉素浓度 0—50U/mL 范围内进行实验求证。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, 细胞大小仅为 23.05(±2.02) μm × 23.50 (±3.11) μm, 而且随着抗生素浓度增加小细胞所占的总数比例亦上升, 实验后期这种比例也越来越高, 这点与光亮裸甲藻在寡盐条件下出现小细胞类似[17], 小细胞形成的生理学机理尚不清楚。

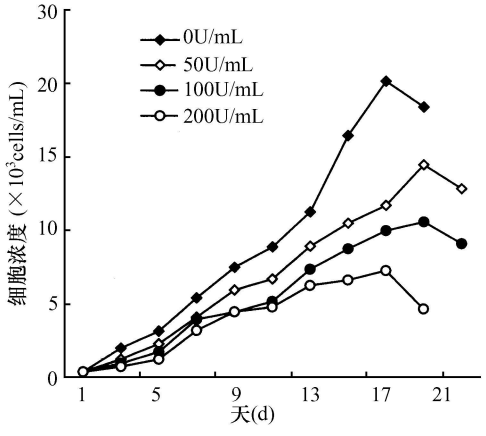


图5　*A. tamarense* 在不同抗生素浓度下的生长曲线

Fig. 5　Growth curves of *A. tamarense* under different antibiotic concentrations

参考文献:

[1] Luckas B. Overview of key pHytoplankton toxins and their recent occurrence in the North and Baltic Seas[J]. *Environ Toxicol*, 2005, **20**(1): 1—17

[2] Yang W D, Zhang X L, Liu J S, *et al*. Inhibitory effect and sinking behaviour of wood meals from China fir on *Alexandrium tamarense* in cultures[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(2): 215—218

[3] Jiang T J, Huang W J, Wang Z H, *et al*. Effects of water temperature, salinity and pH on growth and toxicity of *Alexandrium tamarense* (Lebour) balech (Dapeng Strain) [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2000, **6**(2): 151—154[江天久, 黄伟建, 王朝晖, 等. 几种环境因子对塔玛亚历山大藻(大鹏湾株)生长及其藻毒力影响. 应用与环境生物学报, 2000, **6**(2): 151—154]

[4] Yan T, Zhou M J, Qian P Y. Study on the combined effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2002, **24**(2): 114—120[颜天, 周名江, 钱培元. 环境因子对塔玛亚历山大藻生长的综合影响. 海洋学报, 2002, **24**(2) 114—120]

[5] Shi Y J, Hu H H, Ma R Y, *et al*. Nitrogen and phosphorus absorption and growth characteristics of *Alexandrium tamarense*[J]. *Chin J Appl Ecol*, 2003, **14**(7): 1143—1146[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. 应用生态学报, 2003, **14**(7): 1143—1146]

[6] Wang D Z, Dennis P H Hsieh. Effects of nitrate and phosphate on growth and C2 toxin productivity of *Alexandrium tamarense* CI01 in culture[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, **45**: 286—289

[7] 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]. *Chinese Jonrnal of Oceanology and Limnology*, 2000, **18**(3): 253—259

[8] Zhang Y H, Lian Y W. Effects of phosphorus on the growth of the red tide organism *Alexandrium tamarense* [J]. Marine Environ Sci, 1999, **18**(4): 24—27[张宜辉, 连玉武. 磷对赤潮生物塔玛亚历山大藻的增殖效应. 海洋环境科学, 1999, **18**(4): 24—27]

[9] T Yamamoto. The Seto Inland Sea-eutrophic of oligotrophic? [J]. *Marine Pollution Bulletin* 2003, **47**: 37—42

[10] Li R X, Zhu M Y, Wang Z L, *et al*. Mesocosm experiment on competition between two HAB species in East China Sea[J]. *Chin J Appl Ecol*, 2003, **14**(7): 1049—1054[李瑞香, 朱明远, 王宗灵, 等. 东海两种赤潮生物种间竞争的围隔实验. 应用生态学报, 2003, **14**(7): 1049—1054]

[11] Leng K M, Jiang T J. Analysis on characters of red tide in Shenzhen coastal waters during last more than 20 years[J]. *Ecol Sci*, 2004, **23**(2): 166—174[冷科明, 江天久. 深圳海域近20年赤潮发生的特征分析. 生态科学, 2004, **23**(2): 166—174]

[12] Wang Z F, Zhang Q, Lu Y, *et al*. The Effects of Nutrients, Vitamins and Trace Metals on the growth of the red tide organism *Prorocentrum micans*[J]. *Donghai Marine Science*, 1996, **14**(3): 33—38[王正方, 张庆, 卢勇, 等. 氮、磷、维生素和微量金属对赤潮生物海洋原甲藻的增殖效应. 东海海洋, 1996, **14**(3): 33—38]

[13] You Z C. The effect of vitamin B on toxic dinoflagellate[J]. *Aqua Sci and Tech Info*, 2002, **29**(6): 272[游祖持译. B族维生素对有毒涡鞭毛藻的影响. 水产科技情报, 2002, **29**(6): 272]

[14] Stewart W D P. Algal physiology and biochemistry[M]. Britain: Oxford Press. 1974, 741—787

[15] Xie J M, Mai Z Q, Zhang Z X, *et al*. Preliminary analysis of the vitamin B_1 and B_{12} concentrations for Shenzhen Bay and Dapeng Bay [J]. *Oceanol Limnol Sin*, 1994, **25**(2): 185—189[谢镜明, 麦志勤, 张展霞, 等. 深圳湾、大鹏湾海水和底泥中维生素 B_1, B_{12} 测定结果及初步分析. 海洋与湖沼, 1994, **25**(2): 185—189]

[16] Wang C, Wang Y Y, Sun Y Y, *et al*. Effect of antibiotic treatment on toxin production by *Alexandrium tamarense* [J]. *Biomed Environ*

Sci, 2003, **16**(4):340—347

[17] Lin Y S. Studies on the Growth Characters of a Marine Dinoflagellate, *Gymnodinium splendens* Lebour[J]. *Journal of Xiamen University* (Natural Science), 1994, **33**(4):525—531[林元烧. 光亮裸甲藻的生长特征研究. 厦门大学学报(自然科学版), 1994, **33**(4):525—531]

STUDY ON THE GROWTH OF *ALEXANDRIUM TAMARENSE* BALECH

JIANG Tian-Jiu[1] and XU Yi-Xiao[2]

(1. *Department of environmental engineering, Jinan University, Guangzhou* 510632;
2. *Department of marine Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou* 325035)

Abstract: The present study was to determine the effects of water temperature, nitrogen and phosphorus concentrations, vitamin and antibiotic concentrations on the growth of toxic *Alexandrium tamarense* (Hong Kong Chain ㊦) under experimental conditions. The strains of *Alexandrium tamarense* was isolated in 1998 from Hong Kong sea area where harmful algal blooms (HAB) had frequently occurred, some of which were highly toxic. The results showed that its optimum growth condition was at 21—25 ℃, 882—1765 μmol N/L and 18—72 μmol P/L respectively. When temperature was 21 ℃, nitrogen concentration was 1765 μmol/L and phosphorus concentration was 72 μmol/L, the specific growth rate calculated from microscopic cell counts over the exponential phase of growth attained the higher value of 0.21, 0.28 and 0.28 d^{-1} respectively. Incorporated vitamin made up of B_1, B_6 and B_{12} had positive effect on the growth of *Alexandrium tamarense* when the contents of them ranged from 0, 0 and 0 μg/L to 500, 500 and 1.0 μg/L. The dinoflagellate got their maximal growth rate 0.26 d^{-1} at the highest vitamin concentrations. While the antibiotic (liquid of ampicillin) exceeded 50U/mL had obviously inhibition on it. The cellule algae of *Alexandrium tamarense* was observed in the culture containing antibiotic, and the forming mechanism required extended studies.

Key words: *Alexandrium tamarense;* Temperature; Nutrient concentration; Vitamin; Antibiotic