

改性粘土絮凝后残留的太平洋亚历山大藻 (*Alexandrium pacificum*)毒素变化研究*

宋维佳^{1, 2, 3, 4} 宋秀贤^{1, 2, 3, 4} 李靖^{1, 2, 3} 张悦^{1, 2, 3}
申慧慧^{1, 2, 3, 4} 张培培^{1, 2, 3, 4} 俞志明^{1, 2, 3, 4}

(1. 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266237; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心 青岛 266071; 4. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 改性粘土法是一种高效、环保的有害藻华应急处置技术, 可通过絮凝作用有效去除水体中藻华生物。但利用改性粘土絮凝产毒藻后, 水体中胞内外藻毒素的变化情况目前尚不清楚。文章考察了 I 型改性粘土(MC I)絮凝典型产毒甲藻——太平洋亚历山大藻(*Alexandrium pacificum*)后, 水体中残留藻细胞内和胞外麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish toxins, PSTs)含量、组分的变化情况。实验结果表明, MC I 对密度为 6.11×10^3 cells/mL 的 *A. pacificum* 3 小时去除率达 62%, 水体中残留藻细胞单细胞毒素含量和 PSTs 组分与对照组无显著差异, 但水体中总 PSTs 含量大大降低, 其中由絮凝沉降导致的胞内 PSTs 被去除量占水体中 PSTs 总减少量的 90% 以上。另外, 针对 MC I 对胞外 PSTs 吸附效果的研究发现, 低于 0.5 g/L 的 MC I 对胞外 PSTs 无明显吸附效果, 而在利用 0.2 g/L MC I 絮凝去除大部分亚历山大藻后, 水体中胞外 PSTs 含量无明显变化。由此可以推测该用量下的 MC I 未造成大量藻细胞破裂向水体中释放毒素。该研究结果将为改性粘土治理有毒甲藻藻华的现场应用提供科学依据。

关键词 改性粘土; 亚历山大藻; 絮凝; 麻痹性贝类毒素

中图分类号 Q14 **doi:** 10.11693/hyhz20210100020

有害藻华是一种近海常见的海洋生态异常现象, 对海洋生态系统的平衡、人类的健康与安全构成严重威胁, 已经成为一种全球性的生态安全问题。尤其是近年来, 有害藻华的原因种呈现出向甲藻类、有毒藻类演变的趋势, 有毒甲藻藻华频繁暴发。其中, 亚历山大藻(*Alexandrium*)是我国近海常见的、能够产生麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish toxins, PSTs)的甲藻类群。海域中暴发有毒亚历山大藻藻华后, 由藻细胞合成的 PSTs 毒素可通过食物链进入人类体内引发中毒。全球范围内每年发生约 2 000 起 PSTs 中毒事件, 人员死亡率高达 15% (Anderson *et*

al, 2012)。2002—2017 年间, 该藻在我国近海形成了 24 次藻华(梁玉波等, 2019), 欧洲、北美等全球范围内也曾多次暴发该藻藻华, 不仅破坏了海洋生态环境, 还给海水养殖业和滨海旅游业造成巨大的经济损失。探究水体中亚历山大藻的去除方法及其对水体中 PSTs 毒素含量的影响, 降低亚历山大藻藻华的危害效应尤为重要。

改性粘土技术通过粘土颗粒与藻华生物发生絮凝, 可使藻华生物快速沉降到底层, 达到有效治理有害藻华的效果。该方法具有安全、高效、可操作性强等优点, 成为少数能被应用于有害藻华现场治理的

* 国家自然科学基金项目, 41976148 号; 山东省重大科技创新工程项目, 2019JZZ010808 号; 2019 年度“泰山学者攀登计划”, 泰山学者工程专项经费资助。宋维佳, 硕士研究生, E-mail: songwj178@163.com

通信作者: 宋秀贤, 博士生导师, 研究员, E-mail: songxx@qdio.ac.cn

收稿日期: 2021-01-22, 收修改稿日期: 2021-04-30

技术方法(Anderson, 1997; Yu *et al.*, 2017)。改性粘土不仅可以有效去除水体中的藻华生物(Liu *et al.*, 2016; 邱丽霞等, 2017; Li *et al.*, 2017), 还能吸附水体中的营养物质, 在一定程度上起到改善水质、有效降低水体富营养化程度的作用(Pierce *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2015)。另外, 大量研究表明, 粘土或改性粘土在絮凝去除有毒微藻的同时, 对水体中的藻毒素也能产生良好的去除效果, 如短凯伦藻及其产生的短裸甲藻毒素(brevetoxin, BTX)(Pierce *et al.*, 2004)、小定鞭金藻及其产生的毒素(Sengco *et al.*, 2005)、微囊藻等蓝藻及其产生的微囊藻毒素(Morris *et al.*, 2000)等。

针对 PSTs 毒素, Lu 等(2015)跟踪了改性粘土絮凝沉降太平洋亚历山大藻细胞后沉积絮体中 PSTs 的含量与组成, 结果表明沉积絮体中出现了高毒性组分漆沟藻毒素 1&4 (gonyautoxin-1&4, GTX1&4)向低毒性组分 GTX2&3 和脱氨甲酰基膝沟藻毒素 2&3(decarbamoylgonyautoxin-2&3, dcGTX2&3), 以及无毒性衍生物转化降解的现象。另外, Li 等(2019)的研究也发现, 改性粘土絮凝沉降亚历山大藻后, 沉积絮体中出现 PSTs 毒素的积累, 但在 6 h 后逐渐降低, 96 h 即已低于高效液相色谱法的检出限。目前, 缺乏改性粘土絮凝亚历山大藻细胞后水体中胞内外 PSTs 含量与组成变化情况的研究。

本文研究了改性粘土在絮凝亚历山大藻的同时, 对水体中胞内和胞外 PSTs 毒素的去除效果, 考察了水体 pH、磷酸盐、溶解无机氮(DIN)等影响藻细胞产毒的水质参数的变化情况, 为改性粘土治理亚历山大藻等产毒藻类提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本研究所用藻种为太平洋亚历山大藻(*Alexandrium pacificum*), 来自中科院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室。实验用海水取自青岛汇泉湾近海, 经 0.45 μm 滤膜过滤后 121 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌 30 min。在温度为(20 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 65 $\mu\text{mol photon}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光暗比为 L : D=12 h : 12 h 的环境条件下, 采用 L1 培养液对该藻进行培养。选择密度约为 6.11×10^3 cells/mL 的指数生长期藻细胞进行实验。

本研究所用改性粘土为 I 型改性粘土(MC I), 为取自广西北海的高岭土和无机改性剂聚合氯化铝(poly aluminum chloride, PAC), 参照 Yu 等(1994)的改性方法制备而成。实验开始前采用灭菌海水将其配制

成浓度为 50 g/L 的改性粘土悬浮液。

1.2 实验方法

改性粘土对亚历山大藻的去除实验在体积为 10 L 的玻璃缸中进行, 分为对照组和实验组, 每组设置三个平行。将太平洋亚历山大藻(*A. pacificum*)藻液混匀后倒入玻璃缸中, 实验组加入一定量的改性粘土悬浮液, 使终浓度为 0.2 g/L, 于培养条件下静置 3 h, 然后将上层 5 L 水体通过虹吸的方法小心转移至 5 L 锥形瓶中培养 24 h, 并分别在 3、12、24 h 取样, 进行藻细胞密度, 胞内毒素, 胞外毒素以及 pH、磷酸盐、DIN 等水质参数的测定。

1.3 实验参数的分析测定方法

1.3.1 藻细胞密度的测定 将藻液混合摇匀后移取至离心管中加入鲁哥试剂固定, 通过显微镜计数法得到取样时刻藻细胞密度。

1.3.2 胞内毒素的提取 将藻液通过 GF/D 滤膜过滤收集藻细胞, 用于藻细胞内 PSTs 的提取。样品加入 0.1 mol/L 乙酸溶液, 用核酸提取仪使藻细胞破碎完全。破碎完成后在 6 000 r/min 转速下离心 5 min, 收集上清液, 过 0.22 μm 滤膜于进样小瓶中, -20°C 条件下避光保存待测。

1.3.3 胞外毒素的提取 胞外毒素的提取方法参照张亚亚等(2020), 该藻主要产生漆沟藻毒素(GTX1-5)和 N-磺酰胺甲酰膝沟藻毒素(N-Sulfocarbamoylgonyautoxin-2&3, C1&2), 回收率如表 1 所示。将 ENVI-Carb 500 mg/6 mL 固相萃取柱预先用 3 mL 乙腈、1 mL 超纯水活化, 移取上述经过 GF/D 滤膜过滤的藻液滤液, 通过固相萃取柱, 自然流干后正压挤干, 然后用 75%乙腈水溶液(含 0.25%甲酸)洗脱混匀, 过 0.22 μm 滤膜于进样小瓶中, -20°C 条件下避光保存待测。

表 1 胞外水体 PSTs 富集方法的回收率(张亚亚等, 2020)
Tab.1 Recovery by extracellular PSTs enrichment method

PSTs 组分	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2
回收率(%)	90.9	87.7	84.8	73.7	75.3	92.9	77.2

1.3.4 PSTs 检测方法 本研究中 PSTs 毒素通过高效液相色谱串联质谱法测定。所用仪器为 API4000 液相色谱-三重四级杆串联质谱(ABSCIEX 公司, 美国), 配有电喷雾离子源(ESI)。该方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)如表 2 所示。

液相色谱条件如下: 色谱柱: HILIC Amphion II 色谱柱(5 μm , 4.6 \times 250 mm); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速:

表 2 PSTs 检测方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)

Tab.2 LOD and LOQ of the PSTs detection method

	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2
LOD (ng/mL)	7.4	1.4	6.8	4.2	4.6	2.7	2.0
LOQ (ng/mL)	24.6	4.8	22.5	13.9	15.5	9.0	6.8

1 mL/min; 进样量: 10 μ L; 流动相 A: 乙腈(含 0.1% 甲酸), B: 水(含 2 mmol/L 乙酸铵, 0.1% 甲酸); 洗脱梯度: 0—1.0 min, 60% A, 40% B; 1.0—10.0 min, 60%—10% A, 40%—90% B; 10—15 min, 10% A, 90% B; 15—18.0 min, 10%—60% A, 90%—40% B; 18.0—25.0 min, 60% A, 40% B。

质谱条件如下: 电喷雾离子源(ESI), 多反应监测(MRM), 正离子模式; 喷雾电压: 5.5 kV; 离子源温度 650 $^{\circ}$ C; 碰撞气压力: 7 psi; 气帘气压力: 30 psi; 雾化气压力 GS1: 50 psi; 辅助加热气压力 GS2: 60 psi。

1.3.5 总 PSTs 毒素含量和单细胞毒素含量的计算
总毒素含量=胞内毒素含量+胞外毒素含量; 单细胞毒素含量=胞内毒素含量/藻细胞密度。毒素含量采用相对石房蛤毒素(saxitoxin, STX)的物质的量表示(STX-equ.nmol)。

1.3.6 水质参数的测定 利用 pH 计测定水体的 pH。借助营养盐自动分析仪(Skalar-1000, SA 3000/5000 chemistry unit, 荷兰)测定样品中各项营养盐浓度。

2 结果

2.1 水体中藻细胞密度变化

本文选用指数生长中后期的太平洋亚历山大藻, 利用 MC I 对其进行去除实验。向藻液中添加 0.2 g/L MC I 后, 水体中的藻细胞被迅速絮凝沉降, 3 h 后, 絮凝过程基本完成, 此时上层水体藻细胞密度已由起始的 6.11×10^3 cells/mL 降低至 2.07×10^3 cells/mL, 与相同时刻对照组水体中藻细胞密度相比, 改性粘

土对实验组藻细胞的去除效率约为 62% (图 1)。将上层 5 L 水体通过虹吸的方法小心移出至锥形瓶中继续观察残留藻细胞的增殖情况, 在 24 h 内水体中残留藻细胞密度未发生明显变化。

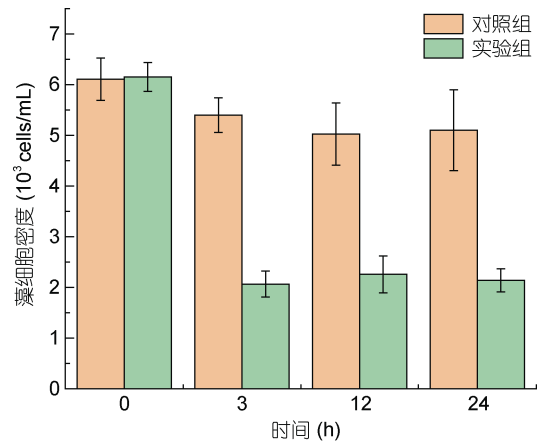


图 1 经 MC I 处理后藻细胞密度变化情况

Fig.1 Change in algal density after MC I treatment

2.2 水体中 PSTs 毒素含量变化

在添加 MC I 絮凝沉降太平洋亚历山大藻后, 我们对水体中 PSTs 毒素含量的变化情况进行了测定和分析。如表 3 所示, 添加 0.2 g/L MC I 处理 3 h 后, 与藻细胞密度变化相对应, 上层水体总 PSTs 含量也发生了显著的改变。与相同时刻对照组相比, 实验组水体中的总 PSTs 含量下降 45.93%。将上层水体移出后继续跟踪了水体中总 PSTs 含量在 24 h 内的变化情况, 结果表明 3—24 h 内实验组总 PSTs 含量持续低于对照组。

MC I 絮凝完成后, 水体中胞内 PSTs 毒素含量的下降幅度与藻细胞密度的下降幅度相接近(表 3), 添加 0.2 g/L MC I 3 h 后, 水体中的胞内 PSTs 含量由原来的 118.28 STX-equ. nmol/L 降低为 37.05 STX-equ. nmol/L, 与此时对照组水体中的胞内 PSTs 含量相比,

表 3 MC I 絮凝后水体中 PSTs 浓度的变化情况(单位: STX-equ. nmol/L)

Tab.3 Change of PSTs concentration in the water after the application of MC I treatment (unit: STX-equ. nmol/L)

时间(h)	总 PSTs			胞内 PSTs			胞外 PSTs		
	对照组	实验组	下降率(%)	对照组	实验组	下降率(%)	对照组	实验组	下降率(%)
0	163.58	163.54	-	122.16	118.28	-	43.70	45.26	-
3	143.32	77.49	45.93	99.23	37.05	62.66	44.09	40.44	8.29
12	139.94	81.20	41.98	95.95	42.52	55.68	43.99	38.67	12.09
24	145.20	92.20	36.50	99.49	47.95	51.80	45.71	44.25	3.20

注: 0 时间点尚未对实验组进行处理, 该时间点下降率用-表示。

实验组下降了 62.66%，与改性粘土对藻细胞的去除率相接近。3—24 h 期间，实验组胞内 PSTs 含量持续远低于对照组。针对胞外水体中的 PSTs 毒素，本研究参照张亚亚等(2020)的处理方法，对其进行了富集，实验过程中胞外 PSTs 含量的变化表明，添加 0.2 g/L MC I 上层水体胞外 PSTs 含量与对照组相比未发生明显改变(表 3)。

在探究 MC I 絮凝后藻液中毒素变化情况的同时，本研究还采用 *A. pacificum* 藻液滤液，实验考察了较高用量 MC I (0.5g/L)对藻液滤液中溶解态 PSTs 毒素的吸附效果，以便于进一步阐明 MC I 絮凝对胞外 PSTs 毒素含量变化的影响机制。结果表明，添加 0.5 g/L MC I 处理 3 h 后亚历山大藻液滤液中 PSTs 毒素含量与组成均无明显变化(图 2)，即 0.5 g/L MC I 对水体中胞外 PSTs 无明显吸附效果。

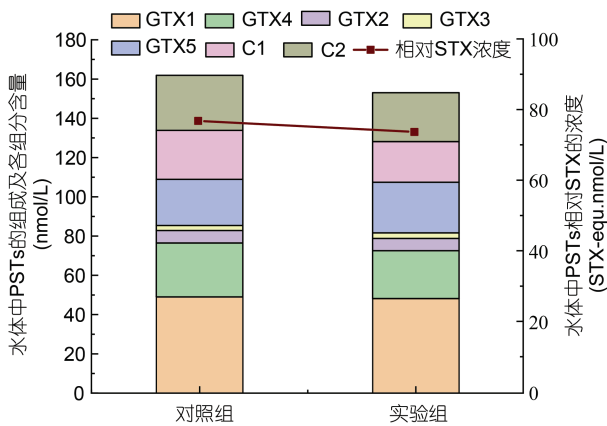


图 2 添加 MC I 后亚历山大藻液滤液中 PSTs 毒素含量与组成变化

Fig.2 Change of PSTs concentration and composition in the filtrate of *Alexandrium* culture after MC I treatment

2.3 单细胞毒素含量与组成变化

为考察 0.2 g/L MC I 的添加是否刺激了残留藻细胞使其产毒增加，本研究对 0.2 g/L MC I 处理后水体中残留藻细胞的单细胞毒素含量(图 3)和胞内外毒素组成(图 4)变化进行了跟踪与测定，结果表明，在该实验条件下 0.2 g/L MC I 的添加未导致实验组残留藻细胞单细胞毒素含量与组成在 24 h 内出现明显差异。

2.4 水质参数变化

本研究还分析测定了添加改性粘土后多种水质参数的变化情况(图 5)。实验用亚历山大藻藻液的初始 pH 约为 8.89，加入 MC I 3 h 后实验组水体 pH 为 8.63，与对照组相比下降 0.22；24 h 时实验组 pH 为

8.52，与此时的对照组相比也仅下降 0.28。总体来看，添加 MC I 后水体 pH 略有下降，但变化幅度较小，整个实验过程对照组与实验组水体 pH 均维持在 8.52—8.91 之间。

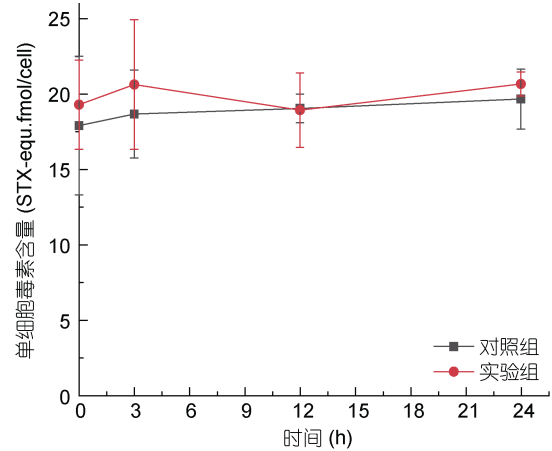


图 3 添加 MC I 后残留藻细胞单细胞毒素含量变化

Fig.3 Changes in the cellular toxin content in the residual algae after MC I treatment

通过跟踪测定实验过程中对照组与实验组水体硝酸盐、亚硝酸盐、铵盐含量变化情况发现，添加 MC I 后水体中的溶解态无机氮含量变化不明显(图 5b)，而水体中磷酸盐含量在 MC I 处理后显著降低，添加改性粘土 3 h 后实验组水体中的磷酸盐含量由 13.78 $\mu\text{mol/L}$ 下降至 5.87 $\mu\text{mol/L}$ ，与对照组相比下降 60.28%，3—24 h 期间实验组磷酸盐含量均远低于对照组的水平(图 5c)。与之相对应，实验组的氮磷比值(N/P)也由于磷酸盐含量的大幅度降低出现了明显高于对照组的现象(图 5d)。

3 讨论

3.1 胞内、胞外 PSTs 对总毒素下降的贡献

MC I 在絮凝去除藻细胞的同时，也大大降低了水体中总 PSTs 含量水平，这与以往的研究结果相一致，即粘土或改性粘土在絮凝产毒藻的同时对水体中藻毒素也具有较好的去除作用。Pierce 等(2004)研究了磷酸盐土对于短凯伦藻(*Karenia brevis*)及其产生的 BTX 毒素的去除效果，结果表明 0.25 g/L 的粘土在絮凝去除藻细胞的同时，可以去除水体中 97%的胞内 BTX 毒素，对于水体中胞外毒素的吸附效果可以达到 70%左右。Sengco 等(2005)研究了 PAC 改性粘土对于小定鞭金藻 *Prymnesium parvum* 的去除过程及毒素的响应，发现改性粘土处理后，上层水体的毒素含量由 24.2 $\mu\text{g/mL}$

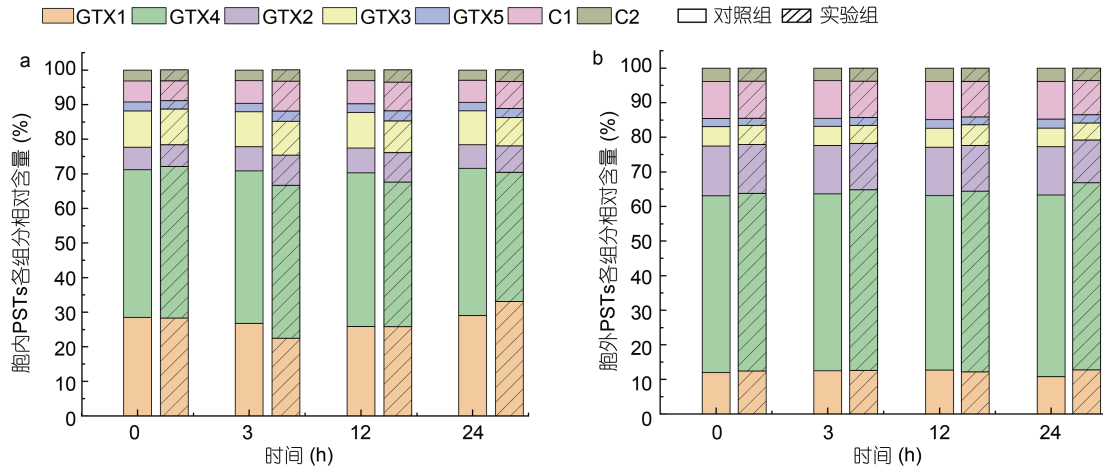


图 4 添加 MC I 后水体中胞内外 PSTs 组成变化

Fig.4 Changes in the composition of intracellular and extracellular PSTs after MC I treatment

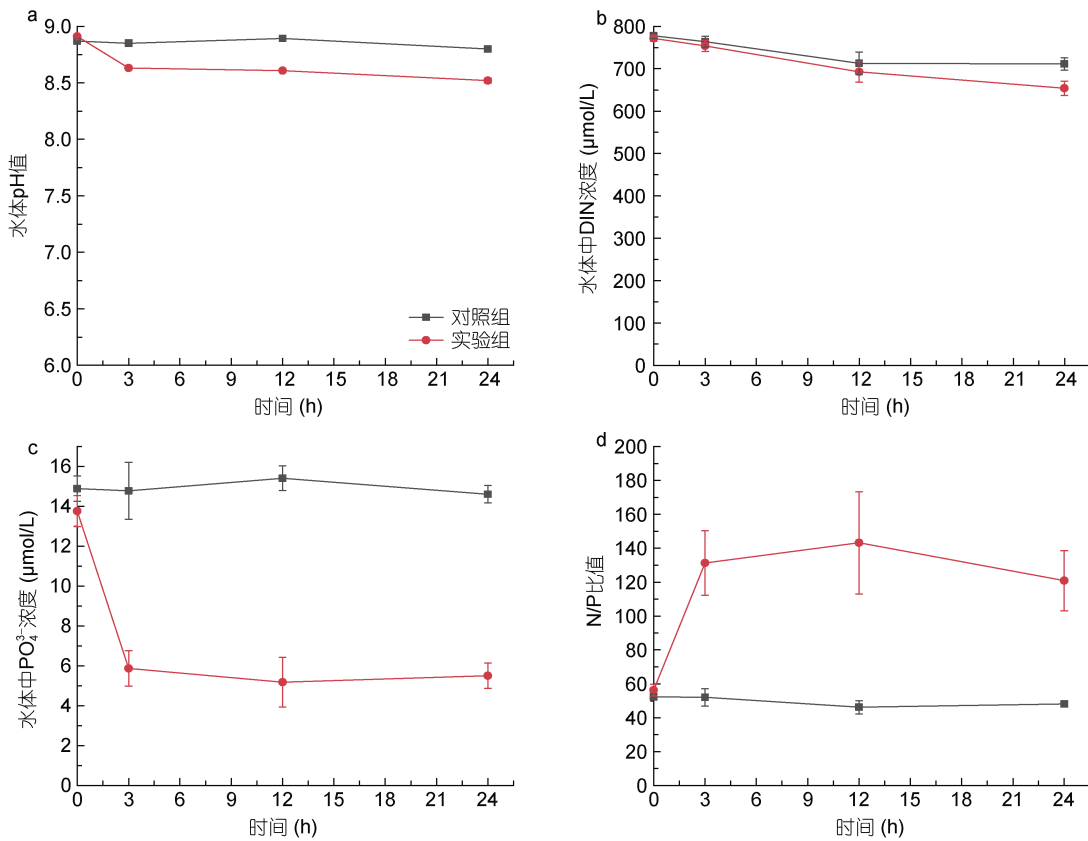


图 5 MC I 处理后水质参数的变化情况

Fig.5 Changes of water quality parameters after MC I treatment

降低至 9.2 μg/mL, 且改性粘土对于上层水体毒素的去除效果与藻细胞去除率具有很好的相关性, 其对毒素的去除效果主要是通过去除藻细胞来实现的。

本研究结果表明, 水体中总 PSTs 的降低主要体现在胞内 PSTs 的降低(图 6), 胞内 PSTs 的降低占总下降量的 90%以上, 也就是说改性粘土在产毒亚历

山大藻藻华治理过程中, 主要是通过去除水体中的产毒藻细胞以达到降低水体中毒素含量的效果。同时水体中总 PSTs 含量与藻细胞密度、总 PSTs 下降量与藻细胞密度下降量均呈现出较强的正相关关系(图 7), 这同样反映出水体中总 PSTs 含量的变化主要源自改性粘土通过絮凝藻细胞去除胞内 PSTs。

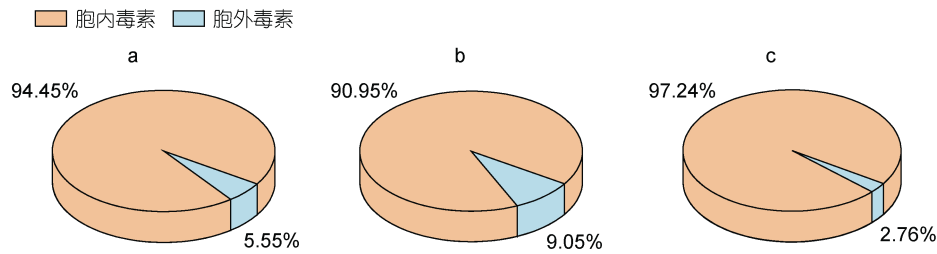


图 6 胞内外 PSTs 毒素对总 PSTs 毒素下降的贡献

Fig.6 Contribution of intracellular and extracellular PSTs to the decrease of total PSTs

注: a: 添加改性粘土 3 h; b: 添加改性粘土 12 h; c: 添加改性粘土 24 h

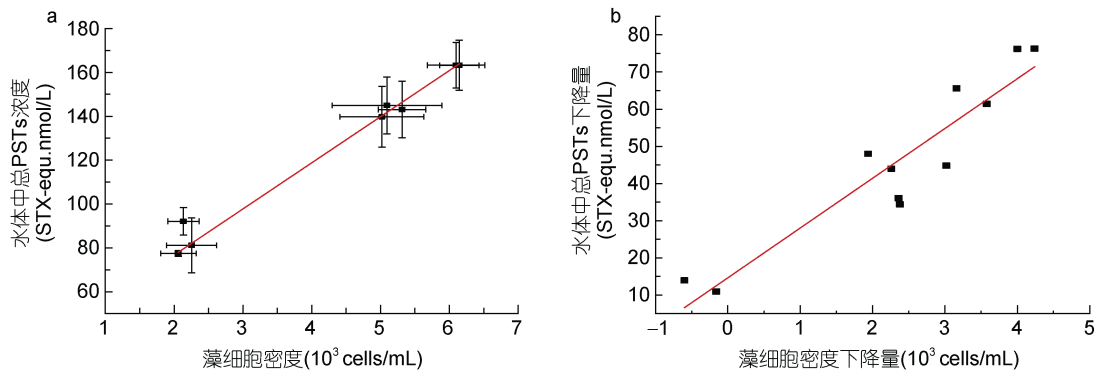


图 7 水体总 PSTs 浓度与藻细胞密度的关系

Fig.7 Relationship between total PSTs concentration and algal density in the water

注: a: 水体中总 PSTs 浓度与藻细胞密度的相关性; b: 水体中总 PSTs 下降量与藻细胞密度下降量的相关性

在本研究中, 添加改性粘土后水体中胞外 PSTs 对总 PSTs 下降的贡献较小。研究表明, 与对照组相比, 添加 0.2 g/L MC I 未使实验组上层水体胞外 PSTs 含量发生显著改变。MC I 作为一种有吸附作用的外源添加物, 可能从两个方面对水体中的溶解态 PSTs 含量产生影响: 一方面, 改性粘土的添加可能会直接碰撞藻细胞或改变藻细胞培养液的水质参数, 从而对藻细胞产生胁迫刺激作用, 使其向水体中分泌 PSTs 毒素, 同时若改性粘土的添加导致部分藻细胞破裂, 这些藻细胞破碎释放的毒素也会直接导致水体中溶解态毒素含量的大幅升高。另一方面, 改性粘土在絮凝藻细胞的同时, 可能对水体中的溶解态 PSTs 毒素也具有一定的吸附作用, 从而导致其含量的降低。而本研究中“胞外 PSTs 含量无明显变化”这一现象出现的原因存在两种可能性: (1) 添加 MC I 后, 藻细胞受到外界刺激向水体中分泌了一定量的藻毒素, 而改性粘土对溶解于水体中的毒素存在一定的吸附或降解作用, 分泌量和吸附量大致平衡; (2) MC I 的添加既未刺激藻细胞向水体中分泌毒素, 也未对水体中的胞外毒素产生吸附作用。针对上述可能的原因, 本文采用 *A. pacificum* 滤液, 实验考察了 MC I 对水体

中 PSTs 毒素的吸附效果。由实验结果可知, 添加 0.5 g/L MC I 后, 水体中 PSTs 含量和组分均无明显变化, 且沉积絮体中未检测到毒素存在。由此可见, 低于 0.5 g/L 的 MC I 对水体中的溶解态 PSTs 毒素无显著吸附效果。结合 MC I 絮凝去除 *A. pacificum* 藻细胞后水体中 PSTs 含量无明显变化这一实验结果, 可以判断在此过程中改性粘土的添加可能没有刺激藻细胞大量破裂释放毒素或刺激藻细胞毒素分泌量升高。即上述第二种猜想更符合添加 MC I 后藻液中胞外 PSTs 变化的实际情况。

3.2 单细胞毒素含量与 PSTs 组成变化

在本研究中, 0.2 g/L 的 MC I 对实验组藻细胞的去除效率约为 62%, 对于水体中残留的藻细胞, 我们分析了其产毒能力是否受到影响。一般来讲, 藻细胞在受到外来环境胁迫时, 其生理生化状态会发生一定的改变。甲藻 PSTs 毒素的生物合成过程也受到温度、营养盐、光照等多种外界环境因素的影响, 环境条件的改变会引起藻细胞毒素的组成和含量发生不同程度的变化。因此, 添加改性粘土后, 由于外来胁迫的干扰, 残留亚历山大藻细胞的单细胞毒素含量极有可能会发生一定的改变。一方面, 粘土颗粒可

能撞击藻细胞直接影响藻细胞生理生化状态, 致使其产毒特征发生改变; 另一方面, 改性粘土的添加势必会引起 pH、营养盐等水质参数发生一定的改变, 这些环境因素的变化一定程度上可对藻细胞产生胁迫, 引起其产毒量的变化。然而在本研究中 0.2 g/L MC I 的添加并未引起单细胞毒素含量与毒素组成的明显改变。

首先, 这一结果的出现可能是因为残留藻细胞未明显受到来自粘土颗粒严重碰撞的影响。改性粘土对于藻细胞的絮凝作用主要来自于经过表面改性的粘土颗粒在海水中与藻细胞间的静电作用、桥连作用、网捕作用, 同时对比前人关于未改性粘土和改性粘土对藻细胞絮凝效果的研究可知, 粘土颗粒自身与藻细胞虽然可能发生直接碰撞, 但由于改性粘土在海水中容易形成絮体, 加之实验所用微藻不易破碎, 因此本研究中絮凝完成后水体中剩余的这部分藻细胞有较大的概率未严重遭受来自粘土颗粒直接碰撞的影响, 或粘土颗粒对其的碰撞强度未达到刺激其产毒增加的程度。

其次, 本研究还从间接影响藻细胞产毒的水质参数的角度, 对添加改性粘土后残留藻细胞单细胞毒素含量无明显升高这一实验结果进行了分析。已有研究表明, 硝酸盐、磷酸盐等水质参数的改变会影响藻细胞的产毒情况(Macintyre *et al*, 1997; Wang *et al*, 2002; Leong *et al*, 2004; Frangópulos *et al*, 2004; Lee *et al*, 2006; Xu *et al*, 2012)。环境中的磷浓度可影响 PSTs 毒素的合成, 胞内毒素含量随着环境中磷含量的升高而降低, 磷限制可以导致亚历山大藻胞内毒素含量显著增加(Frangópulos *et al*, 2004; Lee *et al*, 2006; Xu *et al*, 2012)。而当 N/P 比过高时, 藻细胞中的氮除分配给含磷化合物的合成外, 还可剩余大量的氮用于毒素合成, N/P 比过高也可能导致单细胞毒素含量的升高。在本研究中, 添加 0.2 g/L MC I 后, 水体中硝酸盐、亚硝酸盐、铵盐浓度无明显变化, 磷酸盐含量由初始的 13.78 $\mu\text{mol/L}$ 下降至 5.87 $\mu\text{mol/L}$, N/P 比值也相应出现了明显高于对照组的现象, 但水体中残留藻细胞的单细胞毒素含量却未因环境参数的改变呈现出明显的变化, 推测在本研究中环境参数的改变尚未达到胁迫残留藻细胞增加产毒的程度, 其中的机制、原理尚待深入研究。

在利用改性粘土治理开阔海域有害藻华的实际应用中, 改性粘土的有效用量约为 4—10 t/km² (相当于 4—10 g/m²), 在该用量下对水质等生态环境的影

响基本可以忽略; 另外, 在现场治理过程中, 由于水体交换和海水强大的缓冲能力, 总体而言, 磷酸盐等水质参数在治理前后不会出现明显的变化。因此, 本文可以推断在改性粘土治理亚历山大藻藻华的现场应用中, 残留藻细胞单细胞毒素含量不会因水质而产生变化。

4 结论

(1) 0.2 g/L MC I 在去除水体中 *A. pacificum* 藻细胞的同时, 对水体中总 PSTs 具有良好的去除效果。水体中降低的总 PSTs 毒素主要源于藻细胞的絮凝去除, 胞内 PSTs 的去除占被去除总量的 90%以上。

(2) 本研究中, 改性粘土的添加未刺激藻细胞大量分泌毒素, 水体中残留藻细胞单细胞毒素含量和 PSTs 组分与对照组无显著差异。

(3) 0.5 g/L 的 MC I 对胞外 PSTs 无明显吸附效果, 因此推测低于 0.5 g/L 的 MC I 对胞外 PSTs 亦无明显吸附效果。结合改性粘土处理亚历山大藻藻液后胞外 PSTs 含量无明显变化, 推测 0.2 g/L MC I 未造成大量藻细胞破裂。

参 考 文 献

- 邱丽霞, 俞志明, 曹西华等, 2017. 改性粘土对球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa*) 和东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 的去除作用. 海洋与湖沼, 48(5): 982—989
- 张亚亚, 闫国旺, 吴海燕等, 2020. 基于 SPE 与 SPATT 的水体中麻痹性贝类毒素检测方法构建与应用. 海洋与湖沼, 51(2): 298—306
- 梁玉波, 李冬梅, 姚敬元等, 2019. 中国近海藻毒素及有毒微藻产毒原因种调查研究进展. 海洋与湖沼, 50(3): 511—524
- Anderson D M, 1997. Turning back the harmful red tide. *Nature*, 388(6642): 513—514
- Anderson D M, Cembella A D, Hallegraef G M, 2012. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Annual Review of Marine Science*, 4(1): 143—176
- Frangópulos M, Guisande C, De Blas E *et al*, 2004. Toxin production and competitive abilities under phosphorus limitation of *Alexandrium* species. *Harmful Algae*, 3(2): 131—139
- Lee H O, Ishimaru T, Toshiya K *et al*, 2006. Growth of the Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* isolated from Jinhai Bay, Korea in Axenic cultures. *Korean Journal of Environmental Biology*, 24(3): 275—281
- Leong S C Y, Murata A, Nagashima Y *et al*, 2004. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in response to different nitrogen sources and concentrations. *Toxicon*, 43(4): 407—415

- Li J, Song X X, Zhang Y *et al*, 2017. An investigation of the space distribution of *Ulva* microscopic propagules and ship-based experiment of mitigation using modified clay. *Marine Pollution Bulletin*, 117(1/2): 247—254
- Li J, Song X X, Zhang Y *et al*, 2019. Effect of modified clay on the transition of paralytic shellfish toxins within the bay scallop *Argopecten irradians* and sediments in laboratory trials. *Aquaculture*, 505: 112—117
- Liu Y, Cao X H, Yu Z M *et al*, 2016. Controlling harmful algae blooms using aluminum-modified clay. *Marine Pollution Bulletin*, 103(1/2): 211—219
- Lu G Y, Song X X, Yu Z M *et al*, 2015. Environmental effects of modified clay flocculation on *Alexandrium tamarense* and paralytic shellfish poisoning toxins (PSTs). *Chemosphere*, 127: 188—194
- Macintyre J G, Cullen J J, Cembella A D, 1997. Vertical migration, nutrition and toxicity in the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Marine Ecology Progress Series*, 148: 201—216
- Morris R J, Williams D E, Luu H A *et al*, 2000. The adsorption of microcystin-LR by natural clay particles. *Toxicon*, 38(2): 303—308
- Pierce R H, Henry M S, Higham C J *et al*, 2004. Removal of harmful algal cells (*Karenia brevis*) and toxins from seawater culture by clay flocculation. *Harmful Algae*, 3(2): 141—148
- Sengco M R, Hagström J A, Granéli E *et al*, 2005. Removal of *Prymnesium parvum* (Haptophyceae) and its toxins using clay minerals. *Harmful Algae*, 4(2): 261—274
- Wang D Z, Hsieh D P H, 2002. Effects of nitrate and phosphate on growth and C2 toxin productivity of *Alexandrium tamarense* CI01 in culture. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1/12): 286—289
- Xu J, Ho A Y T, He L *et al*, 2012. Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two *Alexandrium* species from Hong Kong. *Harmful Algae*, 16: 89—97
- Yu Z M, Song X X, Cao X H *et al*, 2017. Mitigation of harmful algal blooms using modified clays: Theory, mechanisms, and applications. *Harmful Algae*, 69: 48—64
- Yu Z M, Zou J Z, Ma X N, 1994. Application of clays to removal of red tide organisms II. Coagulation of different species of red tide organisms with montmorillonite and effect of clay pretreatment. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 12(4): 316—324

TOXIN REMAINED IN RESIDUAL *ALEXANDRIUM PACIFICUM* AFTER FLOCCULATION WITH MODIFIED CLAY

SONG Wei-Jia^{1,2,3,4}, SONG Xiu-Xian^{1,2,3,4}, LI Jing^{1,2,3}, ZHANG Yue^{1,2,3},
SHEN Hui-Hui^{1,2,3,4}, ZHANG Pei-Pei^{1,2,3,4}, YU Zhi-Ming^{1,2,3,4}

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Modified clay method is an efficient and environmentally friendly treatment technology to harmful algal blooms, which can effectively remove algal blooms from water by flocculation. However, the change of intracellular and extracellular toxins in the water after the flocculation is unclear. Changes in content and composition of the intracellular and extracellular residual paralytic shellfish toxins (PSTs) in water after flocculation with modified clay to *Alexandrium pacificum* were investigated. Results show that the removal efficiency of modified clay (MC I in type, formulated by kaolinite and poly aluminum chloride) on *A. pacificum* in density of 6.11×10^3 cells/mL reached 62% in 3 h in 0.2 g/L dosage. Meanwhile, the single-cell toxin content and component of the residual algal cells in water showed no significant difference from those in the control group. However, the total PSTs content in water was greatly reduced, and the removal amount of intracellular PSTs by flocculation and sedimentation exceeded 90% of the total reduction of PSTs in water. In addition, it was found that the MC I under 0.5 g/L had no obvious adsorption on extracellular PSTs. The extracellular PSTs content in water had no significant change after most *Alexandrium* cells were removed by 0.2 g/L MC I. Therefore, using MC I at this concentration could not cause a large number of algal cells to rupture and release toxins into the water. The results of this study provided a scientific reference to the field application of modified clay to control toxic dinoflagellate blooms.

Key words modified clay; *Alexandrium*; flocculation; paralytic shellfish toxins