

粘土矿物对尖刺拟菱形藻多列型 生长和藻毒素产生的影响*

俞志明

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

D V Subba Rao

(Bedford Institute of Oceanography, P O Box 1006, Dartmouth N S, Canada B2Y 4A2)

提要 于1994年1—7月在加拿大贝德福(Bedford)海洋研究所进行粘土矿物(halloysite)对尖刺拟菱形藻(*Psuedonitzschia pungens* f. *multiseries*)生长和藻毒素软骨藻酸(Domoic Acid, 下简称DA)生成的影响研究。在Gompertz菌类生长方程的基础上,建立了尖刺拟菱形藻生长速率模型,得到各实验条件下的藻细胞最大生长速率。结果表明,粘土矿物对藻细胞的“遮荫效应”可导致藻细胞最大生长速率的降低,其幅度随粘土矿物浓度的增加而加大。对软骨藻酸的影响研究发现,在实验浓度范围内,粘土矿物可以抑制软骨藻酸的生成,最大抑制率可达30%以上。

关键词 粘土矿物 赤潮藻 培养 藻毒素

学科分类号 X145

利用粘土矿物治理赤潮是目前国内外首选的赤潮治理方法之一(Shirota, 1989; 俞志明等, 1993)。自70年代末日本初次在鹿儿岛试验场应用以来,许多人围绕该方法的应用和机制进行了大量研究和探讨¹⁾(代田昭彦, 1980),就其抑制机理主要有两种观点:一种立足于粘土粒子和生物细胞的表面性质,认为以吸附作用为主(代田昭彦, 1980);一种则认为是由于粘土中溶出的铝离子杀死赤潮生物细胞所致²⁾(九万田一己, 1982)。作者等人(1994, 1994a, 1994b, 1995)从絮凝作用理论出发,系统研究了粘土矿物对赤潮生物的去毒作用,提出了提高其去毒能力的表面改性方法。本文将在此基础上,通过考察粘土矿物对赤潮生物生长速率的影响和藻毒素软骨藻酸的作用,进一步对其作用机制进行研究和探讨。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

* 国家自然科学基金资助项目, A64951121号。俞志明, 男, 出生于1959年5月, 博士, 研究员, E-mail: zym@ms. qdio. ac. cn

1) 鹿儿岛水产试验场, 1980。赤潮对策技术开发试验报告书。2-(1)

2) 鹿儿岛水产试验场, 1982。赤潮对策技术开发试验报告书。1-(3)

收稿日期: 1996-03-10, 收修改稿日期: 1997-09-15

粘土矿物取自江苏吴县,经研磨、提纯、过筛,取 100 目以上者使用。软骨藻酸标准为加拿大国家海洋分析标准试剂,其检测方法同文献(Subba Rao *et al*, 1988)。其它试剂均为 AR 级。

1.2 赤潮生物培养

尖刺拟菱形藻取自于加拿大爱德华王子岛(Prince Edward Island),经加拿大贝德福海洋研究所纯化、分离,在 10℃, 615 $\mu\text{mol} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 白色荧光灯连续光照下, FE 培养液(Subba Rao, 1988)中培养。

1.3 实验方法

当尖刺拟菱形藻母液生长至指数增长期时(约 7d),以 20:1(培养液:母液)分别接种于数个 1 000ml 的锥形瓶中,加入不同浓度的粘土矿物,在 10℃, 615 $\mu\text{mol} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 白色荧光灯连续光照下, FE 培养液中,低转速连续搅拌下培养,定期分别测定细胞浓度、Chl. *a* 和细胞中的软骨藻酸。细胞浓度测定方法为:取 1ml 藻液于浮游植物计数皿中,在倒置显微镜下计数。Chl. *a* 的测定方法为:取一定体积的藻液通过 25mm 的 GF/F 滤膜,将滤膜转移至具有 10ml 90% 丙酮的具塞瓶中,在 0—4℃ 的冰箱中萃取 24—36h,用荧光方法测定(Subba Rao *et al*, 1993)。软骨藻酸使用 FMOC 方法测定(Subba Rao *et al*, 1988)。

2 结果与讨论

2.1 尖刺拟菱形藻细胞生长速率模型

图 1 为尖刺拟菱形藻在实验条件下的生长曲线及粘土浓度对其生长的影响。图 1 表明其细胞生长规律与海洋其它微藻相似,生长曲线主要由三部分组成:延缓期、指数增长期和静止期,与 Gompertz (Zwietering *et al*, 1990)描述的菌类生长模型相似。根据该模型,细胞增长与时间的关系可定量表达为:

$$y = a \exp[-\exp(b - ct)] \quad (1)$$

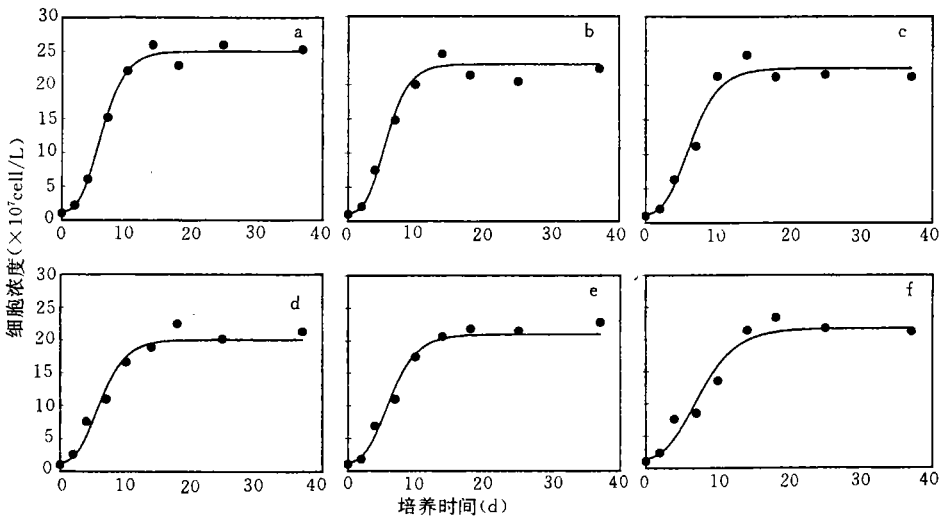


图1 尖刺拟菱形藻在不同粘土浓度下的生长曲线(实心圈为实验值,实线为模型计算值)

Fig.1 Growth of *Pseudonitzschia pungens* f. *muluensis* in the media with different clay concentrations

a. 空白试验; b. 10mg/L; c. 100mg/L; d. 200mg/L; e. 500mg/L; f. 1 000mg/L

这里 $y = \ln(N_t / N_0)$, 其中 N_t, N_0 分别为细胞在 t 和初始时刻的浓度; t 为时间; a, b, c 分别为与实验条件、细胞种类等有关的参数。

分别对方程 (1) 左右两边求时间导数, 得:

$$\frac{dy}{dt} = ac \exp[-\exp(b - ct)] \exp(b - ct) \quad (2)$$

方程 (2) 即为描述细胞生长与时间关系的速率方程。由方程 (2) 可分别求得细胞最大生长速率:

$$V_{\max} = \frac{ac}{e} \quad (3)$$

和达到最大速率所需时间:

$$t_{\max} = \frac{b}{c} \quad (4)$$

式 (3) 中 e 为自然对数底数 2.718。

2.2 粘土浓度对尖刺拟菱形藻细胞生长的影响

本实验采用低速、连续搅拌的培养方法, 使粘土矿物对细胞生长的絮凝影响降至最低程度。由不同粘土浓度下细胞生长实验 (图 1) 可见, 随着粘土浓度的增加, 粘土矿物并未有效地抑制尖刺拟菱形藻细胞的生长, 基本保持原有的生长特征。该结果难以支持粘土体系是通过溶出的 Al^{3+} 离子来抑制赤潮生物细胞生长的观点。

根据上述尖刺拟菱形藻细胞生长速率模型, 对实验数据进行非线性拟合, 分别求得上述参数 a, b, c , 建立不同实验条件下的细胞生长模型。其模拟曲线见图 1, 各计算结果分别列入表 1。

表1 细胞生长速率模型对尖刺拟菱形藻生长实验的计算结果

Tab. 1 Results of the growth rate model for *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseries*

粘土浓度 (mg/L)	0	10	100	200	500	1 000
a	3.158	3.075	3.052	2.939	2.983	2.994
b	1.302	1.378	1.190	1.150	1.146	0.950
c	0.452	0.492	0.416	0.417	0.408	0.317
$V_{\max}(d^{-1})$	0.53	0.55	0.47	0.45	0.44	0.35
$t_{\max}(d)$	2.9	2.8	2.9	2.8	2.8	3.0
相关系数 R	0.999	0.995	0.995	0.992	0.990	0.981

由图 1 和表 1 不难看出, 该实验体系基本符合 Gompertz 方程, 其空白试验 (未加粘土) 的相关系数达 0.999。随着粘土浓度的增加, 该符合程度逐渐降低 (见相关系数的变化), 表明粘土的加入或多或少地影响了细胞的正常生长。由细胞最大生长速率的变化更能反映这种影响作用 (图 2): 在粘土浓度较低 ($< 10 \text{ mg/L}$) 的实验条件下, 尖刺拟菱形藻的最大生长速率基本保持不变 (0.53—0.55 / d); 随着粘土浓度的增加, 该生物细胞的最大生长速率逐渐降低, 其程度也随粘土量的增加而增大。作者认为这种影响主要是由于粘土的加入导致光照效应降低所致。Mayers (1962) 对实验室一次性培养 (batch culture) 下的藻细胞密度与有效光照的关系研究表明: 在低细胞密度时, 细胞间并不影响对入射光的吸收; 但当细胞密度较高时, 细胞间的“遮荫效应” (mutual shading) 将会对细胞的增殖产生负影

响;在一定范围内,细胞生长速率常数与有效光密度成正比。根据该理论,在本实验体系中,由于粘土的加入将导致体系透明度的降低——产生“遮荫效应”。该效应在低粘土浓度下并不显著,但随着粘土量的增加而逐渐增大,从而导致细胞生长速率随着粘土浓度的增加而逐渐降低。

图3是静止期(第37天)时不同培养体系中单位细胞 Chl.a 含量与粘土浓度的关系。图3表明,随着粘土量的增加,细胞 Chl.a 含量逐渐降低。从另一角度说明了粘土矿物对细胞光合作用的影响,与 Mayers 的观点相同。

2.3 粘土矿物对尖刺拟菱形藻分泌软骨藻酸的影响

软骨藻酸是一种神经性藻毒素,以前认为主要产自于某些红藻。1987年加拿大科学

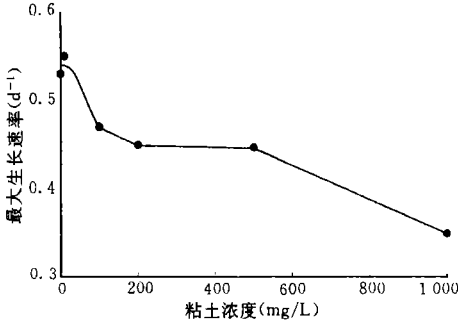


图2 不同粘土浓度培养体系下的尖刺拟菱形藻细胞最大生长速率

Fig. 2 Maximum growth rates of *Pseudonitzschia pungens f. multiseriis* in the media with different clay concentrations

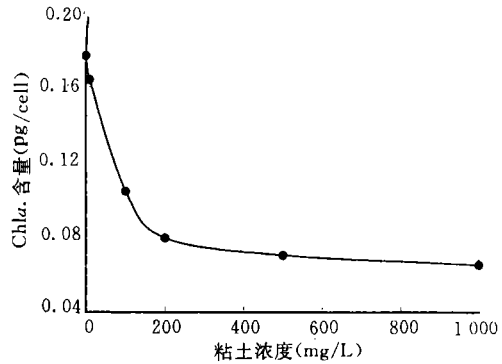


图3 细胞中Chl.a含量与培养体系中粘土浓度的关系曲线

Fig. 3 Relationship between Chl.a per cell and clay concentration of the medium

家首次发现在该国东部生长的尖刺拟菱形藻也能产生软骨藻酸,并由此引发了1987年加拿大 Cardigan 湾三人死亡、逾百人中毒的软骨藻酸食物中毒事件 (Subba Rao *et al*, 1988)。

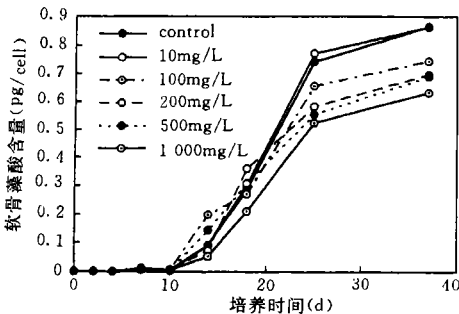


图4 尖刺拟菱形藻生长阶段与软骨藻酸生成的关系

Fig.4 Relationship between the growth period of *Pseudonitzschia pungens f. multiseriis* and domoic acid production

图4是尖刺拟菱形藻生长阶段与软骨藻酸生成的关系曲线,以及粘土浓度的影响。该结果表明,尖刺拟菱形藻在最初生长的4d里没有软骨藻酸生成;从第4天至第10天开始产生软骨藻酸,但数量极少,平均低于0.012pg / cell;大量软骨藻酸生成主要发生在静止期,从第10天到第25天,软骨藻酸浓度急剧增高,可达0.8pg / cell 以上,而后再趋于平缓。

当培养体系中加入粘土矿物后,软骨藻酸产生规律基本与空白实验相同。主要产生阶段也发生在第10天以后,但生成量随粘土浓度的变化有所改变:当粘土浓度较低时(10mg / L),粘土对软骨藻酸的生成影响不大,基本与空白

实验相同;随着粘土浓度的增加,与空白实验相比,软骨藻酸生成量基本呈下降趋势。在实验浓度范围内,最大下降幅度可达空白实验的 1/3。

软骨藻酸是一种游离氨基酸。实验结果表明,该氨基酸主要是在细胞生长后期产生的,可能是藻细胞处在低代谢能力状态下,由其它氨基化合物转化而来。氨基酸是藻细胞体内一类重要化合物,其组成、结构和数量不仅与藻类的生长环境、营养状态有关,而且与藻类的光合作用、代谢作用紧密相联(Fowden, 1962)。在低粘土浓度下,粘土对藻类生长环境、营养状态和光合作用影响极少,所以对软骨藻酸的生成没有较显著的影响。随着粘土浓度的增加,该影响明显增大,主要体现在:1)对水体某些营养成分(如: PO_4^{3-} , SiO_3^{2-} , 微量营养物质等)的吸附作用导致营养环境的变化;2)“遮荫效应”导致光合作用的降低。上述两种影响作用在细胞生长后期尤为显著。所以,实验结果表明粘土矿物对软骨藻酸生成的影响主要体现在细胞生长后期(第 20 天以后),与上述理论分析相一致。目前,对这两种作用的影响机制尚不明确,有待于进一步的实验和研究。

3 结语

结合前文研究(Yu *et al.*, 1994a; 1994b; 1995; 俞志明等, 1994),上述结果进一步说明粘土矿物不仅能够絮凝赤潮生物,抑制赤潮的发生,而且有助于降低某些藻毒素的生成,是一种极有应用前景的赤潮治理方法。

参 考 文 献

- 俞志明 邹景忠 马锡年等, 1993. 治理赤潮的化学方法. 海洋与湖沼, 24(3):314—318
- 俞志明 邹景忠 马锡年, 1994. 一种提高粘土矿物去除赤潮生物能力的新方法. 海洋与湖沼, 25(2):226—232
- 九万田一己, 1982. モンモリロナイトの赤潮に対する浄化作用について. 生态化学, 5(2):38—40
- 代田昭彦, 1980. 赤潮——发生机构と对策. 东京:恒星社厚生阁. 105—124
- Fowden L, 1962. Physiology and Biochemistry of Algae. New York and London: Academic Press. 189—209
- Mayers J, 1962. Physiology and Biochemistry of Algae. New York and London: Academic Press. 603—615
- Shirota A, 1989. Red tide problem and countermeasures. Int J Aqu Fish Technol, 1:25—38, 195—223
- Subba Rao D V, Pan Youlian, Zitko, V *et al.*, 1993. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) associated with a subsurface bloom of *Dinophysis norvegica* in Bedford Basin, eastern Canada. Mar Ecol Prog Ser, 97:117—126
- Subba Rao D V, 1988. Species specific primary production measurements of arctic phytoplankton. Br Phycol J, 23:273—282
- Subba Rao D V, Quilliam M A, Pocklington R, 1988. Domoic acid—a neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. Can J Fish Aquat Sci, 45(12):2 076—2 079
- Yu Zhiming, Zou Jingzhong, Ma Xinian, 1994a. Application of clays to removal of red tide organisms I. Coagulation of red tide organisms with clays. Chin J Oceanol Limnol, 12(3):193—200
- Yu Zhiming, Zou Jingzhong, Ma Xinina, 1994b. 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. Chin J Oceanol Limnol, 12(4):316—324
- Yu Zhiming, Zou Zingzhong, Ma Xinian, 1995. Application of clays to removal of red tide organisms III. The coagulation of kaolin on red tide organisms. Chin J Oceanol Limnol, 13(1):62—70
- Zwietering M H, Jongenburger I, Rombouts F M *et al.*, 1990. Modelling of the bacterial growth curve. Appl Environ Microb, 56:1 875—1 881

IMPACT OF HALLOYSITE ON GROWTH OF *PSUEDONITZSCHIA PUNGENS* F. *MULTISERIES* AND PRODUCTION OF ALGAL TOXIN

YU Zhi-ming

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

D V Subba Rao

(*Bedford Institute of Oceanography, P O Box 1006, Dartmouth, N S Canada B2Y 4A2*)

Abstract The impact of clay (halloysite) on growth of a red tide organism, *Psuedonitzschia pungens* f. *multiseries*, and the production of domoic acid was studied in Bedford Institute of Oceanography, Canada, in January to July 1994. Based on the Gompertz equation of bacteria growth, a growth rate model of *Psuedonitzschia pungens* f. *multiseries* was established and maximum growth rates of algal cells were obtained under various experimental conditions. The results show that the growth of the experimental species is consistent with Gompertz model, but the degree of consistency decreases with the increase of clay concentrations. The clay particles can cause a "mutual shading" effect on the growth of algal cells, which may reduce the maximum growth rate; and the decrease in the rate is enlarged with the increase of clay concentrations. The effect of the clay on domoic acid production is insignificant, even can be neglected if clay concentrations are below 10mg / l. If clay concentrations are higher than this value, then the domoic acid production decreases with the increase of clay concentrations. Thus, the clay can inhibit domoic acid production, with a maximum inhibition efficiency of more than 30%. The reason for such an effect may be a change in nutrient contents in the medium due to clay addition and a decrease in photosynthesis due to the "mutual shading" effect. The results, together with those of the previous studies reported elsewhere, indicate that the clay can not only coagulate the red tide organisms to prevent it from breaking out, but also can decrease the production of some algal toxins. Hence, the use of the clay is a method with a vast range of applications to the control of the harmful red tide.

Key words Clays Red tide organisms Culture Algal toxin

Subject classification number X 145