

强壮前沟藻 (*Amphidinium carterae* Hulburt) 形态特征及其生长特性研究*

韩笑天 颜天[†] 邹景忠^{†1)} 俞志明[†]

(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; 中国科学院研究生院 北京 100039)

[†](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)

摘要 采用实验室内单种分离培养方法,对强壮前沟藻 *Amphidinium carterae* Hulburt 进行光学显微镜和扫描电镜观察、鉴定,描述其形态特征。采用多因子影响强壮前沟藻生长的方法,在不同温度(18℃、23℃、28℃)、不同盐度(10、17、24、30、35)和不同的光照条件下(3800lx、2400lx)的生长情况,以及各种条件组合的相互作用关系,进行了环境因子对该藻生长特性影响的研究。结果表明,细胞最大生长率的最适温度、光照、盐度条件分别为 18℃、3800lx、30。根据强壮前沟藻的生长特性,初步探讨了温度、光照、盐度对该藻形成赤潮的影响。

关键词 强壮前沟藻,形态特征,环境因子,生长率

中图分类号 Q944

赤潮是全球性的海洋灾害,近年呈发生范围不断扩大、频率不断升高、危害日益严重的趋势,鉴于其对海洋生物及人类的潜在威胁,由有毒有害藻形成的赤潮成为国内外学者的研究热点(颜天等, 2002a, b)。甲藻强壮前沟藻 *Amphidinium carterae* Hulburt 是一种能产生溶血性毒素的有害赤潮藻种(Ikuwa, 1975; Yasumoto *et al.*, 1987),主要分布于热带和温带海域,为世界性分布种。对于该藻的生长特性、环境条件对其生长的影响,及其产毒规律等相关研究在国外已有研究报道(Galleron *et al.*, 1979; Olson *et al.*, 1986);而在我国,对于该藻分布的报道仅见南海和海南三亚海域(林永水等, 2001),有关该藻生长特性的研究尚未见报道,因此有必要针对我国沿海环境特征研究其生长特性,了解其形成赤潮的最适环境条件。作者以采集于胶州湾富营养化海域沿岸虾池的强壮前沟藻为研究对象,利用多因子实验设计(颜天等, 2002a, b),进行了温度、盐度和光照强度及这三种环境因子之间的相互作用对这株强壮

前沟藻生长影响的研究,并初步探讨了这三个主要环境因子在强壮前沟藻赤潮形成机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

强壮前沟藻 *Amphidinium carterae* Hulburt 由中国科学院海洋研究所周汉秋先生提供,1999年8月采集于胶州湾东北部上马镇区海域虾池,在本实验室内进行单克隆藻株分离培养,用 Olympus BH-2 型光学显微镜和 KY-1000 型扫描电镜下进行观察并鉴定,在室内(20 ± 1)℃、光照强度为 3500—3800lx、光暗比为 12h:12h 的条件下,于 *f*/2 培养液中培养、观察。

1.2 实验方法

通过定量强壮前沟藻溶液荧光测定法来确定藻细胞浓度。取对数生长期密度最大时藻溶液,分别按递减梯度稀释为 10 个样品,通过测定其荧光值和光镜下记数,作相应荧光值与细胞密度的

* 中国科学院知识创新工程资助项目, KZCX2-206 号; 国家重点基础研究规划资助项目, 2001CB409700 号; 国家自然科学基金资助项目, 40376040 号、20177023 号; 国家自然科学基金重点资助项目, 50339040 号。韩笑天, 硕士, E-mail: xthan@ms.qdio.ac.cn

1) 通讯作者, jzhou@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2002-09-19, 收修改稿日期: 2003-11-14

标准曲线,以确定测定方法。

参照 Parkhill 等(1999)方法,用盐度为 30 的过滤消毒海水加蒸馏水稀释成不同盐度(10、17、24),另在 100℃条件下煮沸 30min 得到盐度为 35 的海水,之后分别加入 $f/2$ 培养液(Nielsen *et al*, 1991),用 ATAGO 手持式盐度计测量盐度。实验起始时取浓度为 7.5×10^4 个/ml 的藻液 1ml 于试管(23 × 150mm)中,加各盐度的消毒海水稀释到 30ml。

光源为白色冷日光灯管,光暗比为 12h:12h,测量光照强度的照度仪型号为 ST-85 型自动量程照度计。采用三因子实验设计,温度分别为 18、23、28℃,光照分别为 3800lx、1400lx,盐度分别为 10、17、24、30、35,共 30 个条件组合(3 × 2 × 5),每个条件设 3 个重复组。

Turner Designs Model 10 荧光计每隔 24h 或 48h(生长不良时)监测活体荧光值。

1.3 计算与统计方法

细胞生长率按 $\mu = (\ln F_2 - \ln F_1) / (t_2 - t_1)$ 计算, F_1 为时刻 t_1 时的荧光值, F_2 为时刻 t_2 时的荧光值。数据分析采用三维 ANOVA Tukey Test 的统计方法(Zar, 1996),用于分析温度、盐度、和光照强度对强壮前沟藻生长的影响及三因子的相互作用关系。

2 结果

2.1 强壮前沟藻形态特征

通过光镜和扫描电镜下观察强壮前沟藻的形

态(图 1)。该藻为单细胞,营浮游生活,细胞为顶尖形或双锥形,上锥部退化,只占其体长的 1/4 或更少。无鞘,藻体长 7—15 μ m,宽 5—7 μ m,上锥部与下锥部通过横沟相连,横沟环绕着上锥部,纵沟位于右侧缘,上锥部只占下锥部的五分之一。带状横鞭毛,纵鞭毛凸出纵沟,并垂直于横沟。藻体内色素体为黄色,有 3—4 个。

2.2 藻细胞密度与荧光值的相关性

将相应浓度测得的荧光值与光镜下细胞计数得到的细胞密度作标准曲线,活体藻细胞密度与其叶绿素含量对应的荧光值呈线性相关($R^2 = 0.9575$),其一元线性回归方程为 $F = 1.9048C$ [F 为样品测得的荧光值, C 为样品藻细胞密度(个/ml)],因此可以通过测活体藻溶液的荧光值来间接得到其细胞密度,并通过此方法来监测不同环境因子条件下强壮前沟藻的生长特性具有良好的灵敏度和精确度。在以下的结果分析中,采用藻细胞密度对应的荧光值来表示细胞生长情况。

2.3 不同温度、光照、盐度条件下强壮前沟藻细胞的生长(表 1)

在温度 18℃、强光照 3800lx 条件下,盐度为 10 时,不利于藻细胞生长,细胞生长缓慢。盐度高于 10 时,生长良好,在培养生长第 5 天时均进入对数生长期,持续期为 5—6 天,细胞数量显著增加。盐度为 30 时得到细胞密度为 1.4×10^5 个/ml,为各条件下的最大细胞密度。在温度 18℃、暗光照 1400lx 条件下,各盐度条件下的细胞增殖均低于强光照条件下的细胞生长情况。盐度

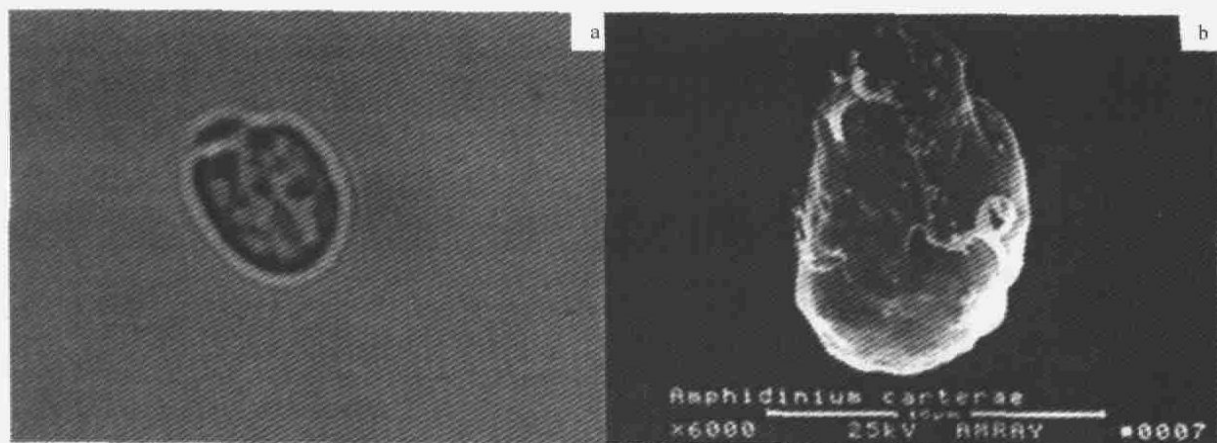


图 1 强壮前沟藻在光镜(a. × 1000)和扫描电镜(b. × 6000)下的形态照片

Fig.1 The photographs of *A. carterae* under light microscope (a. × 1000) and scanning electronic microscope (b. × 6000)

表 1 强壮前沟藻在不同温度、盐度、光照组合条件下的生长率

Tab.1 The growth rate of *A. carterae* under the different temperature, salinity and lightness

温度(℃)	光照(lx)	盐度	生长率(d ⁻¹)		
18	3800	10	0.06 ± 0.02		
		17	0.25 ± 0.01		
		24	0.24 ± 0.01		
		30	0.36 ± 0.02		
		35	0.31 ± 0.01		
		1400	10	0.06 ± 0.02	
			17	0.34 ± 0.03	
	24		0.27 ± 0.02		
	30		0.27 ± 0.01		
	35		0.27 ± 0.01		
	23		3800	10	0.11 ± 0.04
				17	0.24 ± 0.02
		24		0.21 ± 0.02	
		30		0.25 ± 0.02	
35		0.26 ± 0.03			
1400		10		0.03 ± 0.02	
		17		0.14 ± 0.03	
		24	0.26 ± 0.03		
		30	0.10 ± 0.01		
		35	0.25 ± 0.02		
		28	3800	10	0.18 ± 0.02
				17	0.15 ± 0.02
24				0.19 ± 0.04	
30				0.19 ± 0.06	
35	0.27 ± 0.01				
1400	10			0.14 ± 0.02	
	17			0.19 ± 0.03	
	24		0.31 ± 0.01		
	30		0.11 ± 0.02		
	35		0.33 ± 0.02		

为 10 时仍没有细胞增长,培养第 6 天即进入细胞衰亡期。盐度为 35、30 时的对数生长期持续时间为 4 天,细胞密度为 9.5×10^4 个/ml,仅为强光照

条件下最大藻细胞密度的 67%。

在温度 23℃、强光照 3800lx 条件下,盐度为 10 时,藻细胞没有增长。盐度为 23 时,在培养第 7 天,细胞进入对数增长期,但是持续时间只有 3 天,马上进入相对生长下降期,细胞密度逐渐下降,得到藻细胞密度 9×10^4 个/ml。盐度为 35 时,藻细胞在培养生长第 4 天进入对数生长期,维持 6 天得到藻细胞密度 7×10^4 个/ml。盐度为 30 时,生长情况低于 18℃ 相应盐度条件下的生长趋势,且其最大荧光值小于 20,低于 18℃ 时的最大荧光值;在温度 23℃、弱光照 1400lx 条件时,只在盐度为 35 条件下藻细胞稍有生长,细胞密度仅达到 4.6×10^4 个/ml。其他条件下没有明显藻细胞增长。

在温度 28℃、强光照 3800lx 条件下,各盐度条件下的藻细胞均未达到高的细胞密度,其中高盐度(35)相对较好,对数生长期持续期为 2 天,细胞密度为 5×10^4 个/ml。在温度 28℃、弱光照 1400lx 条件下,只有盐度为 24、35 时,细胞稍有生长,其他盐度条件时均未见细胞增长。

2.4 温度、光照、盐度对强壮前沟藻生长率影响及其 ANOVA 分析

由表 1 可见,在 18℃、3800lx、盐度为 30 条件下得到最大生长率为 $0.36d^{-1}$,随着温度的升高,高盐度(35)时有较高的生长率,而盐度为 30 时的生长率有所下降,均低于 $0.20d^{-1}$;在同一温度下,不同光照时,生长率没有很大差异。

通过变量方差 ANOVA 分析,包括各环境因子的主效应、二维、三维交互效应分析,得到温度、光照、盐度及其相互作用对于细胞生长率的显著性差异值(表 2)。主效应影响分析中,盐度对该藻生长率的影响呈非常显著性意义,盐度效应的显著性概率小于 0.01 ($P < 0.01$),光照、温度对细胞

表 2 温度、光照、盐度对强壮前沟藻生长率影响的变量方差分析(ANOVA)

Tab.2 ANOVA analysis of temperature, lightness and salinity versus the growth rate of *A. carterae*

项目	偏差平方和	自由度 df	均方	F	P
盐度	0.106	4	2.648E-02	7.959	0.000 *
温度	1.539E-02	2	7.693E-03	2.312	0.123
光照	1.160E-02	1	1.160E-02	3.488	0.075
盐度 × 温度	3.075E-02	8	3.843E-03	5.928	0.011
温度 × 光照	2.915E-02	2	1.457E-02	22.478	0.001 *
盐度 × 光照	8.113E-03	4	2.028E-03	3.129	0.080
盐度 × 温度 × 光照	0.206	29	7.107E-03	—	—

* 显著性差异 $P < 0.01$

生长率主效应影响作用不显著;二维交互效应中温度与光照相互作用对该藻生长率有非常显著性差异,而盐度与温度、盐度与光照的二维效应作用没有显著性差异;三维交互效应 ANOVA 分析,温度、光照、盐度三者协同作用不显著。

实验结果表明,盐度对强壮前沟藻细胞生长的影响作用明显,低盐度条件下不利于藻细胞生长,细胞生长适应期较长,并很快进入细胞衰亡期,该藻生长适宜盐度为 17—35,盐度作为主效应影响是关键环境因子。关于温度对藻细胞生长的影响,藻细胞生长的适宜温度范围为 18—23℃,最适宜温度条件为 18℃,随着温度升高,适宜盐度范围减小,细胞对数生长持续期减小,由 18℃时的对数生长期 6 天减少到 28℃时的 2 天。在较高温度(23℃、28℃)时,高盐度(35)条件下的藻细胞有着较好的生长优势,而较低盐度(30)条件下的生长率较低。光照对藻细胞生长影响不显著,光照强弱条件下细胞生长率无显著差别,说明该藻有较好的光合调节能力。由实验结果可知,光照与温度共同作用使细胞生长率表现出非常显著的差异,在研究光照、温度这两个环境因子对该藻生长的影响时,需考虑它们的协同作用。

3 讨论与结语

强壮前沟藻为温带和热带海域世界性分布种,在我国主要发现于南海和海南岛三亚海域(林永水等, 2001),在胶州湾内为首次发现,并单种分离培养,通过光镜和扫描电镜下细胞形态观察,鉴定该藻种为强壮前沟藻。

多因子影响研究表明,强壮前沟藻细胞生长最适条件为 18℃、3800lx、盐度为 30,得到最大生长率和最大细胞密度。盐度对其生长有显著影响,是该藻生长的关键性环境因子,在低盐的环境下生长缓慢,不易达到高密度。从实验结果还可得出,强壮前沟藻适应的温度、光照范围较广,这与该藻是世界性分布种、且为底栖性藻种类的情况相符(Yasumoto *et al.*, 1987);并且强壮前沟藻有着较好的光合调节能力,能够快速调节适应低光照强度的能力,能随着细胞浓度的增加而提高光合色素体的数量(Olson *et al.*, 1986),这与实验中得出的不同光照没有使细胞生长率呈显著性差异的结果相同。另据报道,该种藻在高温条件下易形成孢囊,Sampayo(1985)实验研究表明,在温度为 28—30℃、光暗比为 16h:8h 时,该藻极易

形成孢囊,在适宜条件下萌发,形成游动细胞,这与实验中该藻在较高温度条件、盐度 30 时生长率较低且不能达到细胞高密度相符。由实验结果分析可以得出,强壮前沟藻在春秋季节水温较低、近岸高盐的条件下易形成赤潮,应引起有关部门的重视。

有关强壮前沟藻毒素的研究,Ikuwa (1975)、Yasumoto 等(1987)等就已证明该藻产生溶血性毒素,Paul 等(1996)对毒素中的胆碱类物质的抗真菌和溶血性进行了研究。胶州湾沿岸海域的强壮前沟藻是否也属产毒藻株?其毒素成分及其营养动力学将在后期实验中进行,以期对该赤潮藻赤潮形成机制、毒性效应等方面作进一步的探讨。

致谢 中国科学院海洋研究所周汉秋老师提供藻种,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 林永水,周近明,何建宗,2001. 赤潮生物. 北京:科学出版社, 18—22
- 颜 天,周名江,钱培元,2002a. 环境因子对塔玛亚历山大藻生长的综合影响. 海洋学报, 24(2): 114—120
- 颜 天,周名江,钱培元,2002b. 赤潮异弯藻 *Heterosigma akashiwo* 的生长特性. 海洋与湖沼, 33(2): 209—214
- Ikuwa M, 1975. Chemical and physiological studies on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. In: Vincent R L ed. The First International Conference Toxic Dinoflagellate Blooms. Massachusetts: Massachusetts Science and Technology Foundation, 323—332
- Galleron C, Durrand A M, 1979. Cell cycle and DNA synthesis in a marine dinoflagellate *Amphidinium carteri*. *Protoplasma*, 100: 155—165
- Nielsen M V, Tonseth C P, 1991. Temperature and salinity effect on growth and chemical composition of *Gyrodinium aureolum* Hulbert in culture. *J Plankton Res*, 13: 389—398
- Parkhill J P, Cembella A D, 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from north eastern Canada. *J Plankton Res*, 21: 939—955
- Paul G K, Matsumori W, Konoki K *et al.*, 1996. Structure of Amphininol 3 and its cholesterol-dependent membrane perturbation: a strong antifungal metabolites produced by dinoflagellate, *Amphidinium klebsii*. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y ed. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Harmful and Toxic Algal Blooms, 503—506
- Olson R J, Chisholm S W, 1986. Effects of light and nitrogen limitation on the cell cycle of the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *J Plankton Res*, 8: 785—793
- Sampayo M, 1985. Encystment and excystment of a Portuguese

isolate of *Amphidinium carterae* in cultures. In: Anderson D M, White A W, Baden D G ed. Toxic Dinoflagellates. New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc, 125—130
Yasumoto T, Seino N, Murakami Y *et al*, 1987. Toxins produced

by benthic dinoflagellates. Biol Bull Mar Biol Lab Woods Hole, 172(1): 128—131
Zar J H, 1996. Biostatistical Analysis, 3rd edition. Upper Saddle River N J: Prentice Hall International, Inc, 1—95

MORPHOLOGICAL FEATURES AND GROWTH CHARACTERISTICS OF THE DINOFLAGELLATE *AMPHIDINIUM CARTERAE* HULBURT

HAN Xiao-Tian, YAN Tian[†], ZOU Jing-Zhong[†], YU Zhi-Ming[†]

(Key Laboratory of Marine Ecology & Environmental Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

[†](Key Laboratory of Marine Ecology & Environmental Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Harmful algae are microscopic, single-celled plants that live in the sea. Most species of algae or phytoplankton are not harmful and serve as the energy producers at the base of the food web, without which higher life on this planet would not exist. Unfortunately, a small number of species produce potent toxins that can be transferred through the food web where they affect and even kill the higher forms of life such as zooplankton, shellfish, fish, birds, marine mammals, and even humans that live either directly or indirectly on them. Species of the genus *Amphidinium* have been thought as one of the toxin-producing Harmful Algae Bloom dinoflagellates.

Genus *Amphidinium* belongs to the Gymnodiniidae family. Differences can be observed between *Amphidinium* and *Gymnodinium* in position of the annulus of girdle. In *Gymnodinium*, the girdle is located in the center, while in *Amphidinium*, it is located at the anterior end. *A. carterae* Hulburt is a cosmopolitan shallow water species in temperate and tropical zones. Some species of the genus *Amphidinium* have been linked to red tides and discolouration of sand in subtidal areas. Toxin production has also been reported. Cells of *A. carterae* were toxic to fish and mice. Crude extracts of the organism also had a significant effect on molluscan, crustacean, amphibian heart activity and caused contractions in the intestines of mice. Furthermore, the seasonal blooms of *A. carterae* coincided with increasing levels of fish mortality.

In Chinese waters, *A. carterae* mainly distributed in south Hainan coastal regions, north of the South China Sea. This is the first recording of *A. carterae* in Jiaozhou Bay, China. Unialgal cultures were developed in Guillard's medium of enriched sea water (30 salinity). 300ml of culture was maintained under standard growth conditions: (18 ± 1) °C and 12h:12h light:dark illumination with cool-white daylight lamp irradiance (3000lx).

Morphological features of *A. carterae* isolated from shrimp ponds in Jiaozhou Bay was observed by optical microscopes and scanning electron microscope. Growth of the alga was studied in unialgal batch cultures under different conditions. Controlled experiments were conducted on cell density under 30 different conditions of varying temperature (18 °C, 23 °C, 28 °C), salinity(10, 17, 24, 30, 35) and light (3800lx, 2400lx). Effects of variable environmental factors on cells' density were measured by Turner Design Fluorometer every 24 hours. Maximum growth rate of *A. carterae* (0.36 divisions/d) was obtained in ambient of 18 °C, 30 salinity and 3800lx. Demonstrated by ANOVA analysis, salinity and temperature-light interaction have a significant impact on the growth. Based on physiological characteristics, the dinoflagellate may become potential outbreaks of red tide in future.

Key words *Amphidinium carterae*, Morphological characteristics, Environmental factors, Growth rate