

初始密度对微小亚历山大藻生长及产麻痹性贝类毒素的影响

卞中园, 杨锡洪, 解万翠*, 章超桦, 李 翥, 杨亚东

(广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室,

广东省普通高等学校水产品深加工重点实验室, 国家贝类加工技术研发分中心(湛江), 广东 湛江 524088)

摘要:为研究微小亚历山大藻生长和产麻痹性贝类毒素(PSP)的规律,采用不同初始密度对微小亚历山大藻进行培养,综合采用显微镜计数、小鼠生物检测(MBA)、高效液相色谱—柱后衍生(HPLC-FLD)等方法分析微小亚历山大藻在不同接种密度条件下的生长和产毒特性。结果表明,随着初始密度增加微小亚历山大藻通过静止期的时间缩短,到达最大生长密度的时间提前,但是生长的最大细胞密度和平均比生长率却呈下降趋势,增值模型反应的情况与观测结果相一致,随着初始密度的增加,依赖于初始种群密度的参数(a)减少,环境容量(K)减少,种群瞬时增殖速度(r)下降。4种不同初始密度(0.05×10^4 、 0.10×10^4 、 0.15×10^4 、 0.30×10^4 cells/mL)条件下,微小亚历山大藻细胞的毒性呈现先增大后减小趋势,在初始密度为 0.1×10^4 cells/mL 条件下,同一生长期细胞毒性比其他3个密度条件下高。HPLC检测微小亚历山大藻含有的毒素为 GTX1-4,含量分别为 2.14、2.08、4.97、5.04 fmol/cell。综合考虑微小亚历山大藻在生长过程中的细胞最大密度、达到最大密度所用时间以及细胞毒性大小等因数,采用 $(0.10 \sim 0.15) \times 10^4$ cells/mL 接种密度培养微小亚历山大藻,能够达到较好的产毒效果。

关键词:微小亚历山大藻;初始密度;生长特性;麻痹性贝类毒素

中图分类号: Q 948; S 917

文献标志码: A

麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish poisoning toxins, PSP toxins)是一种神经性毒素,通常与神经细胞膜结合,影响和阻止 Na^+ 向细胞内流动,从而无法形成正常的动作电位,进而抑制神经传导,导致神经性麻痹中毒。目前已发现至少有 24 种 PSP 毒素^[1],包括氨基甲酸酯类毒素(STX、NEO、GTX1-4),去氨甲酰基毒素(doSTX、dcNEO、dcGTX1-4),N-磺酰氨基甲酰基类毒素(B1、B2、C1-4),以及近几年新发现了一类含有羟基苯甲酯基类毒素(GC-1、GC-2、GC-3)。有资料报道,1972—1982年日本中毒者达1192人,1981年西班牙有5000人中毒,1983年菲律宾300人中毒,并有21人死亡。截至目前,全球沿海地区都有麻痹性贝类中毒致死事件的报道^[2]。我国的四大海域(渤海、黄海、东海、南海)都有PSP毒素存

在^[3],据不完全统计,自20世纪60年代以来,国内沿海地区报道的中毒事件超过160起,中毒者1000多人,死亡近60人,最近一起PSP中毒事件是2008年7月江苏省连云港市发生一起食用受PSP毒素污染的菲律宾蛤仔中毒事件,共6人发生食物中毒,其中1人死亡^[4]。

PSP毒素主要产自海洋中的单细胞甲藻,是目前已知海洋赤潮藻毒素中引发毒害事件最频繁、对人类影响最严重的一种毒素^[5]。微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*)是产PSP毒素的主要甲藻之一,其生长和产毒随生长环境、营养盐密度的不同而不同^[6-7],国内外学者主要研究温度、盐度、光照、N源、P源等对微小亚历山大藻生长和产毒的影响^[8-11],而起始密度对其影响很少见报道。起始密度也是影响微藻迅速繁殖的关键

收稿日期:2012-07-21 修回日期:2012-10-13

资助项目:国家自然科学基金项目(31271938);现代农业产业技术体系(贝类48)建设专项

通信作者:解万翠,E-mail:xiewancui@163.com

因素之一^[12],微藻在繁殖过程中遵循着阿利氏规律(Allee's law),即每个物种都有适合自己生长和繁殖的最佳种群密度,种群密度过高或过低对种群的发展都是不利的。因此研究初始密度对微小亚历山大藻生长和产毒的影响,找到适合微小亚历山大藻生长的最佳接种密度,获得大量藻细胞,对 PSP 毒素的提取和贝类毒素蓄积及脱除等方面研究有着重要意义。

1 材料与方法

1.1 藻种来源及试剂

藻种来源 本实验所培养的微小亚历山大藻(AMTW 株系)来自于暨南大学生命科学院,并于广东海洋大学水产学院实验室接种培养。

试剂 12 种标准毒素,分别是 C1/2、GTX1~5、dcGTX2/3、NEOSTX、dcSTX 和 STX,购自加拿大海洋生物研究所海洋分析化学标准组;离子对试剂:庚烷磺酸钠,购自日本东京化成工业株式会社(TCI-Ace);四丁基磷酸铵:购自 SIGMA 公司;高碘酸;购自 ALFA Aesar A Johnson Matthey 公司;乙腈:美国 TEDIA 公司生产;其它试剂如磷酸、盐酸等,均为分析纯,购自广州化学试剂有限公司;HPLC 分析用水是 Millipore 超纯水系统生产的超纯水;酸化剂:0.5 mol/L 的乙酸溶液;氧化剂:50 mmol/L 磷酸二氢钾的缓冲溶液含有 10 mmol/L HIO₄, pH 9。

1.2 培养条件

海水用 6 层纱绢过滤后,分别经过 4 层滤纸、0.45 和 0.22 μm 孔径的醋酸纤维膜过滤,置于三角瓶中灭菌,冷却后,按照 f/2 培养基配方^[13],在无菌操作台上,以初始密度为 0.05 × 10⁴、0.10 × 10⁴、0.15 × 10⁴、0.30 × 10⁴ cells/mL 接种对数生长期的微小亚历山大藻于 1 L 三角瓶(所用试剂和玻璃器皿皆经过 121 °C,高压灭菌 25 min),藻液体积约为 800 mL,每个浓度组做 3 个平行,放置于光照培养箱。培养条件:温度为(25 ± 1) °C,光照强度为 4 000 ~ 5 000 lx,光暗比为 12 L:12 D,每天上午、下午、晚上各摇匀一次。

1.3 实验方法

微小亚历山大藻比生长率的计算 海洋浮游植物的比生长率(μ)与其生长过程密切相关,表示单位时间单位体积内的产物量。可以用以下公式计算^[14]:

$$\mu = \frac{\text{Ln}N_t - \text{Ln}N_0}{t_1 - t_0} \quad (1)$$

式中, N_t 为 t_1 时的细胞密度, N_0 为 t_0 时的细胞密度。

微小亚历山大藻增殖模型 当浮游生物接种到培养液后,种群增长在开始时缓慢,然后进入指数生长期迅速繁殖,接着增长率会下降,并逐渐达到一个平稳的阶段,繁殖率与死亡率几乎相等,随着环境条件的恶化,种群数量在平稳期后会迅速下降^[15]。Peurl 和 Reed 在 1920 年提出逻辑斯蒂方程来描述这一增长模式:

$$N_t = \frac{K}{1 + e^{(a-rt)}} \quad (2)$$

式中, N_t 为 t 时刻的种群密度, K 为环境容量, a 为依赖于初始种群密度的参数, r 为瞬时增长率。在 JMP 中,进行参数估计,置信水平为 95%。

绘制生长曲线 每天上午 9 ~ 10 时摇匀藻液并取样 1 mL,加入 1 滴 Luglos 试剂使其固定,用容积为 0.1 mm³ 的浮游生物计数框在显微镜下计数,每个样重复计数 3 次,取平均值,绘制藻细胞生长曲线。

PSP 毒素提取 摇匀藻液,取样 50 mL 置于 6 000 r/min 条件下离心 10 min,小心吸掉离心管中的上清液,加入 5 mL 0.1 mol/L 的乙酸溶液重新悬浮,在冰水浴中超声波破碎(功率为 100 W,每工作 3 s,停 3 s),直到在显微镜下观测到至少有 95% 的藻细胞被破碎为止,再次以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤,滤液置于 -20 °C 冰箱中保存直至毒素含量分析。

PSP 毒素的小白鼠生物检测法(MBA)

参照 AOAC 制定的标准方法操作,实验的小白鼠为雄性昆明系小白鼠,体质量为(20 ± 1) g,取以上样品 1 mL,对小鼠进行腹腔注射,每个样做 3 次平行,毒性鼠单位的计算以 20 g 的小白鼠在腹腔注射后 15 min 内死亡的致死量规定为一个鼠单位(MU)。

PSP 毒素的高效液相色谱(HPLC)法检测

采用 Oshima 等^[16]分析方法并加以改进,分析过程采用 3 次等梯度洗脱。第一次分析 GTX1 ~ 5 和 dcGTX2/3 类毒素,洗脱液为 10 mmol/L 磷酸铵缓冲液含有 3.0 mmol/L 庚烷磺酸钠作为离子对试剂,pH 为 7.1;第二次分析 STX 类毒素,洗脱液为 30 mmol/L 磷酸铵缓冲液含有 2.0 mmol/L-

庚基磺酸钠, pH 为 7.1, 并按 93.5:6.5 的比例加入乙腈; 第三次分析 C 类毒素 (C1/2), 洗脱液为 1.2 mmol/L 的四丁基磷酸铵溶液, 用氨水调整 pH 至 6.5。柱后衍生氧化剂为含有 10 mmol/L 高碘酸和 50 mmol/L 磷酸氢二钾的缓冲液, pH 为 9.0, 酸化剂为 0.5 mol/L 的乙酸溶液。洗脱液流速为 0.8 mL/min, 氧化剂和酸化剂的流速均为 0.4 mL/min, 色谱柱柱温 33 °C, GTX 类毒素和 STX 类毒素的柱后衍生温度为 75 °C, C 类毒素的柱后衍生温度为 65 °C。样品中 PSP 毒素的 HPLC 定量测定: 每个水平的 3 个平行实验样品连续测定, 每个毒素组分的峰面积取平均值, 然后与相邻的两个标准样品对照进行定量计算, 以减小毒素组分峰面积变化所造成的误差。

2 结果与讨论

2.1 初始密度对微小亚历山大藻生长的影响

由图 1 可知不同接种密度条件下随着时间的延长微小亚历山大藻细胞密度逐渐增加, 当到达最大密度后细胞停止生长, 藻密度开始下降。方差分析表明, 增加微小亚历山大藻初始浓度可以显著缩短静止期时间 ($P < 0.01$) 和达到最大浓度的时间 ($P < 0.05$), 并且极显著降低细胞生长的最大浓度 ($P < 0.01$)。这与其他藻类, 如亚心形扁藻 (*Platymonas subcordiformis*)^[17]、三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*)^[18]、赤潮微藻^[19] 的研究结果一致。王正方等^[20] 认为这是由于藻生长增殖过程中耗用环境中营养物质的情况决定的, 在营养物质的量相等的情况下, 藻液起始密度高, 对营养物质消耗多, 因而耗尽的速度就高于起始密度低的, 于是峰值提前出现。Wang 等^[21] 通过响应曲面法分析各种环境和营养盐对小球藻生物量的影响发现, 初始密度与 C 源、N 源、光照强度一样都是影响小球藻生长的重要因素。

实验所用微小亚历山大藻在初始密度为 0.05×10^4 cells/mL 条件下生长达到稳定期时的最大密度为 5.2×10^4 cells/mL, 与微小亚历山大藻 (Amtk-9) 最大生长密度为 5.33×10^4 cells/mL^[22] 相似, 而 Hwang 等^[23] 对微小亚历山大藻 (T1) 生长的温度、营养盐、pH、光照、盐度条件优化后生长的最大细胞密度仅为 1.5×10^4 cells/mL, Parker 等^[24] 采用充 CO₂ 气体方式培养的微小亚历山大藻生长的最大密度可达到 5.5×10^5 cells/mL, 比本次培养的藻密度高出 1 个数量级。

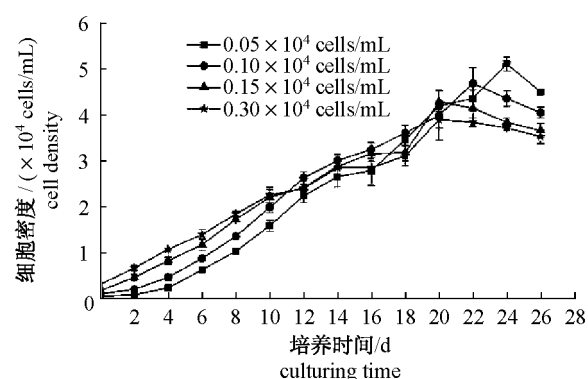


图 1 不同起始密度条件下微小亚历山大藻的生长曲线
Fig. 1 The growth curves for *A. minutum* at different initial cell densities

2.2 初始密度对微小亚历山大藻比生长率的影响

在初始密度较高 (0.15×10^4 、 0.30×10^4 cells/mL) 条件下, 接种后立即达到最大比生长率, 分别为每天 (1.11 ± 0.07)、(0.76 ± 0.09), 随后开始逐渐降低; 而初始密度相对较低 (0.05×10^4 、 0.10×10^4 cells/mL) 条件下, 比生长率呈现出在细胞生长静止期到指数生长前期时升高, 而在指数生长中期到稳定期之间呈逐渐下降趋势, 最大比生长率分别为每天 (1.11 ± 0.21)、(0.81 ± 0.03)。图 2 表示不同初始密度条件下微小亚历山大藻在生长过程中的比生长率, 4 种不同初始密度条件下培养的微小亚历山大藻比生长率分别在培养的第 26、24、22、22 天后为负值, 表明细胞生长进入死亡期。在一个生长周期内初始密度为 0.05×10^4 、 0.1×10^4 、 0.15×10^4 、 0.30×10^4 cells/mL 的平均比生长率分别为每天 (0.339 ± 0.001)、(0.290 ± 0.001)、(0.238 ± 0.002)、(0.187 ± 0.003), 即初始密度越大, 平均比生长率越小, 经方差分析 ($P < 0.01$, $\alpha = 0.01$), 表明不同初始密度对微小亚历山大藻的比生长率有着极显著影响。尽管本次培养的微小亚历山大藻的最大生长密度没有 Parker 等^[24] 的研究中的高, 但是在低初始密度 (0.05×10^4 cells/mL) 条件下培养的微小亚历山大藻最大比生长率可达每天 1.1, 而 Parker 等^[24] 的研究中培养的微小亚历山大藻最大比生长率 $\mu < 0.4$, Chang 等^[25] 在最佳光照和营养盐条件下培养的微小亚历山大藻最大比生长率为每天 0.5, 其他经济藻类如杜氏盐藻 (*Dunaliella tertiolecta*)、海链藻 (*Thalassiosira*

pseudonana)、角毛藻 (*Chaetoceros calcitrans*) 分别为每天 1.4、1.8、2.0^[26],与经济藻类相比微小亚历山大藻的比生长率较低,但也有例外,如 Grzebyk 等^[27]培养的微小亚历山大藻最大比生长率在细胞分裂前期达每天(1.21 ± 0.13)在对数生长期的平均生长率最大可达到每天(0.82 ±

0.03)以上,本实验的微小亚历山大藻在 4 组不同初始密度条件下,在指数生长前期最大比生长率可达每天 1.1(0.05 × 10⁴ cells/mL),最小为每天 0.75(0.3 × 10⁴ cell/mL),可能是由于不同的藻属对不同环境的适应^[28]。

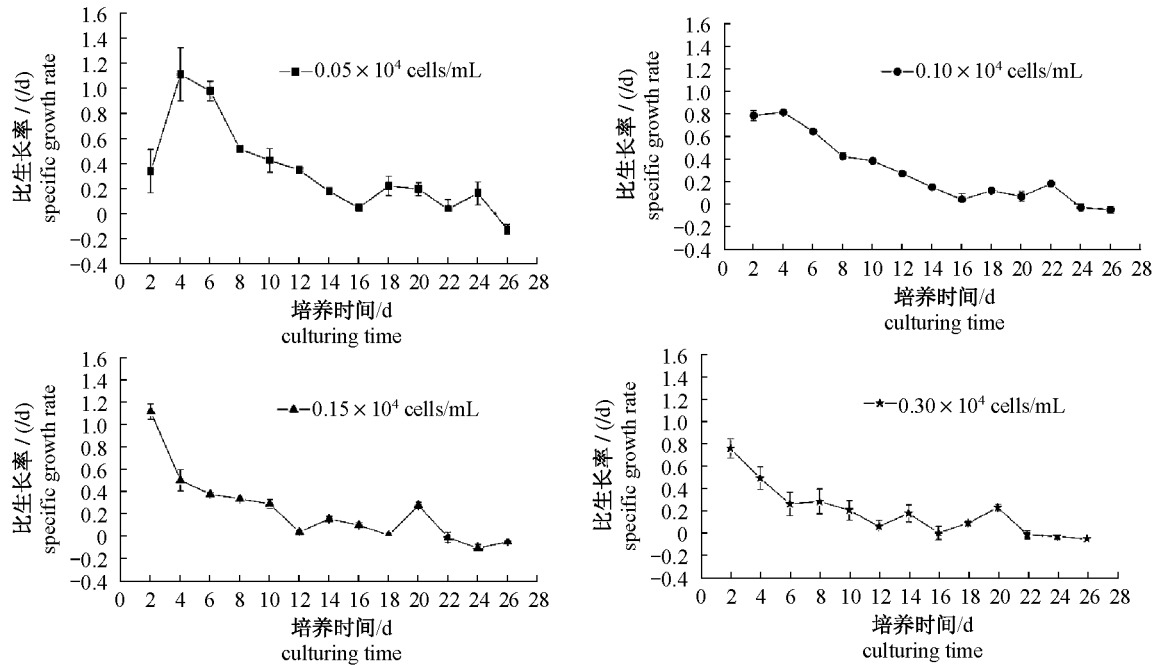


图 2 不同初始密度条件下微小亚历山大藻比生长率

Fig. 2 Specific growth rate for *A. minutum* at different initial cell densities

2.3 微小亚历山大藻增殖模型

4 种不同初始密度微小亚历山大藻增殖方程分别为

$$N_{t1} = \frac{50481.18 \pm 2894.90}{1 + e^{[(3.32 \pm 0.84) - (0.30 \pm 0.03)]t}} \quad (R^2 = 0.983)$$

$$N_{t2} = \frac{43777.37 \pm 1564.27}{1 + e^{[(3.04 \pm 0.67) - (0.27 \pm 0.03)]t}} \quad (R^2 = 0.985)$$

$$N_{t3} = \frac{40273.72 \pm 1963.67}{1 + e^{[(2.37 \pm 0.75) - (0.24 \pm 0.04)]t}} \quad (R^2 = 0.969)$$

$$N_{t4} = \frac{38437.41 \pm 1742.35}{1 + e^{[(1.88 \pm 0.57) - (0.21 \pm 0.03)]t}} \quad (R^2 = 0.974)$$

初始密度分别为 0.05 × 10⁴、0.10 × 10⁴、0.15 × 10⁴、0.30 × 10⁴ cells/mL 条件下生长的微小亚历山大藻依赖于初始种群密度的参数(*a*)、环境容量(*K*)、瞬时增长速度(*r*)的变化经方差分析表明,增加初始密度可以极显著降低环境容量(*P* < 0.01)和依赖于初始种群密度的参数(*P* <

0.01),显著减小种群瞬时增殖速率(*P* < 0.05),增殖模型反应的情况与观测结果一致。在董云伟等^[29]的研究表明,随着初始密度的增加,塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 环境容量 (*K*) 减少,而赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*) 环境容量没有显著变化;塔玛亚历山大藻种群瞬时增长率(*r*)没有显著变化,赤潮异弯藻群瞬时增长率(*r*)增加。李峰等^[17]培养的亚心形扁藻增殖模型反应出,随着接种密度增加,依赖于初始种群密度的参数(*a*)减少,瞬时增长率(*r*)下降,而环境容量(*K*)却增加。本次实验结果表明随着初始密度的增加,微小亚历山大藻生长所依赖于初始种群密度的参数(*a*)减少,环境容量(*K*)减少,而种群瞬时增殖率(*r*)下降。虽然,不同藻种的生长都符合逻辑斯蒂增长模型,但是所反应出的结果因藻种的不同而存在差异。

2.4 MBA 法测定不同初始密度微小亚历山大藻细胞毒性的变化

通过 MBA 法检测不同初始密度条件下微小亚历山大藻在不同生长期内细胞毒性的变化(图3)。由图3可知:接种后细胞毒性逐渐增加,在指数生长前期达到最大值,随后迅速下降。4种不同接种密度条件下生长的微小亚历山大藻分别在生长的第10、8、10、10天达到最大毒性,最大毒性分别为 (7.87 ± 0.47) 、 (11.92 ± 1.23) 、 (8.30 ± 0.50) 、 $(8.85 \pm 0.28) \times 10^{-6}$ MU/cell。有毒微藻接种后藻中毒素含量在指数生长前期达到最大值,随后迅速下降直到细胞生长稳定期^[30-32],细胞中毒素含量变化趋势与细胞生长趋势相反^[33-34]。本实验采用 MBA 方法检测生长过程中细胞毒性的变化同样符合这一规律,Anderson^[35]认为细胞毒素含量反应了每个细胞的毒素的合成与泄露(分解代谢、泄露、细胞分裂

导致的)之间的平衡关系,毒素的含量不仅与细胞所在的生长阶段有关,而且与细胞内 N 的组成有关。同时,不同生长阶段的营养盐的不均衡^[36-37]以及一次培养过程中二氧化碳的逐渐缺乏和环境因素的改变都会导致细胞毒素含量的变化。

相同时间段4种接种密度条件下生长的微小亚历山大藻所产 PSP 毒素毒性存在波动性(图3),在细胞生长的静止期、停滞期以及死亡期,初始密度为 0.05×10^4 cells/mL 与 0.10×10^4 cells/mL 条件下生长的微小亚历山大藻细胞毒性没有显著差异($P > 0.05$),在对数生长期前者细胞毒性显著低于后者($P < 0.05$);初始密度为 0.15×10^4 cells/mL 与 0.30×10^4 cells/mL 条件下生长的微小亚历山大藻在整个生长过程中细胞毒性没有显著差异($P > 0.05$)。

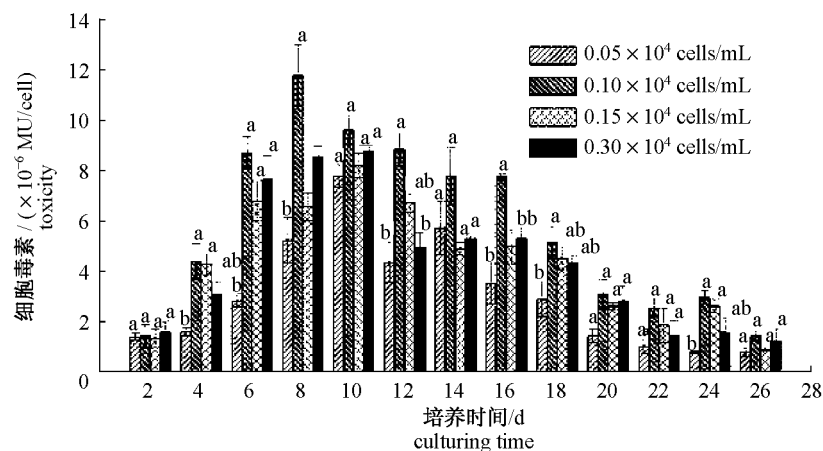


图3 不同初始密度条件下微小亚历山大藻生长过程中细胞毒性的变化

Fig. 3 Changes of cell toxicity during *A. minutum* growth at different initial cell densities

2.5 HPLC-FLD 对微小亚历山大藻中 PSP 毒素的分析

微小亚历山大藻毒素组成和含量见表1,不同地区的微小亚历山大藻的毒素组成和毒性大小有很大差别^[38],Chang等^[39]在1993年从新西兰丰盛湾分离的两株微小亚历山大藻主要产NEO和少量的GTX1-4,不含有C类和B类毒素。来自爱尔兰科克港的一株微小亚历山大藻只含有GTX2/3两种毒素,其中GTX3约占80%^[40]。本研究中的微小亚历山大藻毒素成分主要为GTX1~4,含量分别为2.14,2.08,4.97,5.04 fmol/cell(表1),而不含有其他种类的毒素,其中GTX4的含量所占比例

最多,为35.42%,其次为GTX3占34.93%,与刘晓丽等^[41]培养的链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)相比毒素组成较为单一。

表1 微小亚历山大藻所含毒素的组成和含量
Tab. 1 Toxin ingredient and content of *A. minutum*

毒素成分	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	总计
含量/(fmol/cell)	2.14	2.08	4.97	5.04	14.23
百分比/% percentage	15.04	14.61	34.93	35.42	100

3 结论

通过对比不同初始密度对微小亚历山大藻生

长和产毒的影响,可以得出:(1)接种密度越高,微小亚历山大藻通过静止期和达到最大密度的时间越短,生长的最大浓度和平均比生长率越小。藻种需达到一定的密度,从开始培养藻类就在培养液中占优势,同时也缩短了培养周期,这是藻类培养的成功经验^[42],本实验采用较高接种密度有利于微小亚历山大藻的生长;(2)在指数生长前期微小亚历山大藻细胞毒性达到最大值,生长过程中细胞毒性呈现先升高后下降趋势,不仅细胞分解代谢和生长环境的变化影响微小亚历山大藻生长过程中毒素含量和毒性,同时微藻的共生微生物也影响着微小亚历山大藻的产毒^[43-44],因此有必要对微藻生长环境和共生微生物进行研究,以期探究生长过程中毒性变化的确切原因;(3)多数研究表明微小亚历山大藻所产毒素主要含有 GTX 类毒素,不含有其他类型的毒素^[45-47],本实验微小亚历山大藻产毒符合这一规律,其中 GTX4 和 GTX3 是毒素优势组分,分别占 35.42% 和 34.93%。综上所述,考虑藻细胞在生长过程中的最大生长密度、达到最大密度所用时间以及细胞毒性大小等因素,采用 $(0.10 \sim 0.15) \times 10^4$ cells/mL 接种密度培养微小亚历山大藻。

参考文献:

- [1] Etheridge S M. Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives [J]. *Toxicon*, 2010, 56(2): 108 - 122.
- [2] 刘智勇,计融. 麻痹性贝类毒素研究进展 [J]. *中国热带医学*, 2006, 6(2): 340 - 344.
- [3] 林燕棠,贾晓平,杨美兰,等. 中国沿岸染毒贝类的麻痹性毒素 [J]. *热带海洋学报*, 1999, 18(1): 90 - 95.
- [4] 林祥田,庞中全,张雨,等. 一起贝类膝沟藻毒素中毒调查分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2009, 21(3): 265 - 267.
- [5] Garcia C F, Gallardo R J, Sánchez M A, *et al.* Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates [J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(2): 176 - 194.
- [6] Lim P T, Leaw C P, Usup G, *et al.* Effects of light and temperature on growth, nitrate uptake, and toxin production of two tropical dinoflagellates: *Alexandrium tamiyavanichii* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) [J]. *Journal of Phycology*, 2006, 42(4): 786 - 799.
- [7] Hwang D F, Lu Y H. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum* [J]. *Toxicon*, 2000, 38(11): 1491 - 1503.
- [8] Lim P T, Leaw C P, Kobiyama A, *et al.* Growth and toxin production of tropical *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) under various nitrogen to phosphorus ratios [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22(2): 203 - 210.
- [9] Lim P T, Ogata T. Salinity effect on growth and toxin production of four tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae) [J]. *Toxicon*, 2005, 45(6): 699 - 710.
- [10] Parkhill J P, Cembella A D. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarensense* from northeastern Canada [J]. *Journal of Plankton Research*, 1999, 21(5): 939 - 955.
- [11] 李瑞丹, 仵彦卿. 不同 N、P 比例对微小亚历山大藻产毒特性的影响 [J]. *海洋环境科学*, 2010, 29(4): 504 - 508.
- [12] 曾玲. 光照周期、温度和起始密度对利玛原甲藻(一亚株)生长的影响 [J]. *热带海洋学报*, 2010, 29(6): 137 - 142.
- [13] 成永旭. 生物饵料培养学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 79 - 80.
- [14] Guillard R R L. Handbook of phycological methods [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1973: 289 - 312.
- [15] 沈国英, 施并章. 海洋生态学 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] Oshima Y, Machida M, Sasaki K, *et al.* Liquid chromatographic-fluorometric analysis of paralytic shellfish toxins [J]. *Agriculture Biology Chemistry*, 1984, 48(7): 1707 - 1711.
- [17] 李锋, 葛长宇, 方建光, 等. 不同温度和接种密度下亚心形扁藻增殖的初步研究 [J]. *海洋水产研究*, 2007, 28(6): 61 - 66.
- [18] 朱艺峰, 郭小强. 不同氮磷硅含量和接种密度对三角褐指藻生长的影响 [J]. *中国水产科学*, 2000, 7(4): 47 - 50.
- [19] 蔡恒江, 唐学玺, 张培玉, 等. 不同起始密度对 3 种赤潮微藻种间竞争的影响 [J]. *生态学报*, 2005, 25(6): 1331 - 1336.
- [20] 王正方, 张庆, 龚敏. 海洋原甲藻增殖最适起始密度及其同温度的关系 [J]. *海洋环境科学*, 1993, 12(2): 44 - 47.
- [21] Wang L L, Zhao B T, Zhang Y X. Prediction of energy microalgae production under flue gas using

- response surface methodology [J]. *Energy Procedia*, 2012, 16 (part B): 1066 – 1071.
- [22] 缪宇平, 袁骥, 周宏农, 等. 环境因子对 *A. minutum* Amtk-9 生长与产毒的综合影响 [J]. *海洋渔业*, 2009, 31(3): 279 – 287.
- [23] Hwang D F, Lu Y H. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum* [J]. *Toxicon*, 2000, 38(11): 1491 – 1503.
- [24] Parker N S, Negri A P, Frampton D M F, et al. Growth of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) using high biomass culture systems [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2002, 14(5): 313 – 324.
- [25] Chang F H, McClean M. Growth responses of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) as a function of three different nitrogen sources and irradiance [J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 1997, 31(1): 1 – 7.
- [26] Thompson P A, Harrison P J, Whyte J N C. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton [J]. *Journal of Phycology*, 1990, 26(2): 278 – 288.
- [27] Grzebyk D, Béchemin C, Ward C J, et al. Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* [J]. *Journal of Plankton Research*, 2003, 25(10): 1185 – 1199.
- [28] Leong S C Y, Murata A, Nagashim Y, et al. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarensense* in response to different nitrogen sources and concentrations [J]. *Toxicon*, 2004, 43(4): 407 – 415.
- [29] 董云伟, 董双林, 刘相义. 不同起始浓度对塔玛亚历山大藻和赤潮异弯藻种群竞争的影响 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2004, 34(6): 964 – 968.
- [30] Usup G, Kulis D M, Anderson D M. Growth and toxin production of the toxic dinoflagellate *Prodinium bahamense* Var. *compressum* in laboratory cultures [J]. *Natural Toxins*, 1994, 2(5): 254 – 262.
- [31] Boczar B A, Beitler M K, Liston J, et al. Paralytic shellfish toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture [J]. *Plant Physiology*, 1988, 88(4): 1285 – 1290.
- [32] Cembella A D, Sullivan J J, Boyer G L, et al. Variation in paralytic shellfish toxin composition within the *Protogonyaulax tamarensis/catenella* species complex: Red tide dinoflagellates [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1987, 15(2): 171 – 186.
- [33] Ogata T, Ishimaru T, Kodama M. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarensis* [J]. *Marine Biology*, 1987, 95(2): 217 – 220.
- [34] Proctor N. H, Chan S L, Trevor A J. Production of saxitoxin by cultures of *Gonyaulax catenella* [J]. *Toxicon*, 1975, 13(1): 1 – 9.
- [35] Anderson D M, Kulis D M, Sullivan J J, et al. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp [J]. *Marine Biology*, 1990, 104(3): 511 – 524.
- [36] Krystyna F, Fernández J M, Pablo F, et al. Changes in toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen or phosphorus stress [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1994, 111: 99 – 109.
- [37] Smith G J, Zimmerman R C, Alberte R S. Molecular and physiological responses of diatoms to variable levels of irradiance and nitrogen availability: Growth of *Skelatonema costatum* in simulated upwelling conditions [J]. *Limnol Oceanogr*, 1993, 37(5): 989 – 1007.
- [38] 邹迎麟, 朱明远, Sherwood H. 两种亚历山大藻产毒过程和毒素特征研究 [J]. *黄渤海海洋*, 2001, 19(3): 65 – 70.
- [39] Chang F H, Anderson D M, Kulis D, et al. Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand [J]. *Toxicon*, 1997, 35(3): 393 – 409.
- [40] Touzet N, Franco J M, Raine R. Influence of inorganic nutrition on growth and PSP toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Cork Harbour, Ireland [J]. *Toxicon*, 2007, 50(1): 106 – 119.
- [41] 刘晓丽, 章超桦, 解万翠, 等. 链状亚历山大藻的培养及麻痹性贝类毒素的提取和检测 [J]. *水产学报*, 2010, 34(11): 1783 – 1788.
- [42] 陈明耀. 海洋饵料生物培养 [M]. 北京: 农业出版社, 1980: 40 – 106, 208 – 210.
- [43] Lu Y H, Chai T J, Hwang D F. Isolation of bacteria from toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* and their effects on algae toxicity [J]. *Journal of Natural Toxins*, 2000, 9(4): 409 – 417.
- [44] Prol J M, Guisande C, Barreiro A, et al. Evaluation

- of the production of paralytic shellfish poisoning toxins by extracellular bacteria isolated from the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55 (8) : 943 – 954.
- [45] Chou H N, Chen Y M, Chen C Y. Variety of PSP toxins in four culture strains of *Alexandrium minutum* collected from southern Taiwan [J]. Toxicon, 2004 (43) : 337 – 340.
- [46] Hwang D F, Lu Y H. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum* [J]. Toxicon, 2000, 38 (11) : 1491 – 1503.
- [47] 张青春, 于仁诚, 周名江, 等. 不同类型含磷营养物质对微小亚历山大藻 (*Alexandrium minutum*) 生长和毒素产生的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2005, 36 (5) : 465 – 474.

Effects of different inoculation densities on growth and toxin production of *Alexandrium minutum*

BIAN Zhongyuan, YANG Xihong, XIE Wancui* , ZHANG Chaohua, LI Zhu, YANG Yadong

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety ,
Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution ,
National Research and Development Branch Center for Shellfish Processing (Zhanjiang) ,
College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Effects of different inoculation densities on growth and toxin production of *Alexandrium minutum* were studied. Experiments were conducted under conditions of varying inoculation densities (0.05×10^4 , 0.10×10^4 , 0.15×10^4 , 0.30×10^4 cells/mL). Higher inoculation densities always resulted in shorter lag phase of *A. minutum*, and an earlier setting in of the steady growth phase. However, the specific growth rate and maximum cell concentration of *A. minutum* decreased with increasing inoculation densities. The multiplication models developed correlated well with the observations, as the inoculation density increased, the initial-density dependent parameter a also decreased and the reduction of environmental capacity, instantaneous multiplication included. According to MBA analysis, toxicity of *A. minutum* is typically highest when cells are growing fast in early exponential phase and lowest as growth slows and eventually stops in plateau phase. The PSP-toxin congeners, GTX1 (2.14 fmol/cell), GTX2 (2.08 fmol/cell), GTX3 (4.97 fmol/cell), GTX4 (5.04 fmol/cell) were analysed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). Result of this study implied that toxin production of the dinoflagellate *A. minutum* is better in $0.10 \times 10^4 - 0.15 \times 10^4$ cells/mL than other condition of inoculations densities.

Key words: *Alexandrium minutum*; inoculation density; biological characteristic; paralytic shellfish poison (PSP)

Corresponding author: XIE Wancui. E-mail: xiewancui@163.com