

潘莉莉,王大志. 两种抗生素对塔玛亚历山大藻生长和产毒的影响[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(1):85- 89. Pan Li- li, Wang Da- zhi. Effects of two antibiotics on growth and toxin production of *A. Tamarensis* CI01[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 34(1):85- 89.

两种抗生素对塔玛亚历山大藻生长和产毒的影响

潘莉莉, 王大志*

(近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门大学, 福建 厦门 361005)

摘要: 论文以中国南海筛选的一株塔玛亚历山大藻 *Alexandrium tamarensis* CI01 为研究对象, 研究了两种抗生素, 氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 和新霉素 (neomycin, Nm) 对 *A. tamarensis* CI01 细胞生长、形态以及毒素含量的影响。结果表明 和空白对照组相比 经 1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nm 处理过的藻细胞密度增长速度比较慢 经 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 处理过的藻细胞虽然会发生质壁分离现象 但藻细胞密度增长速度比较快 通过高效液相 (HPLC) 分析藻细胞的毒素含量发现两种抗生素均明显降低了 *A. tamarensis* CI01 细胞中毒素的含量。同时监测加入抗生素后 *A. tamarensis* CI01 藻培养液中细菌数量和磷酸盐浓度的变化 揭示 1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nm 和 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 加入 *A. tamarensis* CI01 后 抑制或杀死了能产毒或有利于产毒的细菌 或者是影响了细胞内参与毒素合成的酶从而干扰了毒素的正常合成 而导致藻细胞毒素合成能力降低。

关键词: 塔玛亚历山大藻; 麻痹性贝毒; 抗生素; 生长; 毒素含量

中图分类号 X55 文献标志码 A doi :10.3969/j.issn.1003-6504.2011.01.020 文章编号 :1003-6504(2011)01-0085-05

Effects of Two Antibiotics on Growth and Toxin Production of *A. Tamarensis* CI01

PAN Li-li, WANG Da-zhi*

(State Key Lab of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Two antibiotics, viz. ampicillin (Amp) and neomycin (Nm) were investigated regarding their effects on a toxic dinoflagellate, *A. tamarensis* CI01, which was isolated from the South China Sea. The study found that Nm concentration of 1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ retarded the growth rate of the algal cell, while 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Amp stimulated the cells growth though resulting in sloughing-off of part of the cell walls. Analysis of the toxin content of *A. tamarensis* CI01 by HPLC indicated that both of the antibiotics decreased the toxin of the algae through inhibition of the activity of toxin-producing or toxin-benefiting bacteria. Otherwise the antibiotics might influenced some enzymes involved in toxin biosynthesis, leading to the decreased toxin producing capacity of *A. tamarensis* CI01.

Key words: *A. tamarensis* CI01; paralytic shellfish poisoning; antibiotics; growth; toxin content

亚历山大藻 (*Alexandrium* sp.) 是一种广泛分布的、能引起赤潮的有毒甲藻。据报道, 亚历山大藻中的很多种类能产生一种神经类毒素——麻痹性贝毒 (paralytic shellfish poisoning, PSP)^[1]。目前对亚历山大藻的产毒生理已有了较多的研究^[2-3], 但对 PSP 的来源还存在争议, 主要围绕在有毒藻与细菌之间的关系展开的。藻-菌之间既存在营养依赖关系, 又存在拮抗关系^[4-6]。早在 20 世纪 80 年代初期, Silva 就提出甲藻内共生细菌产毒的假说, 认为海洋细菌在有毒藻产毒过程中起着重要的作用^[7-8]。Kodama 等 1990 年首次从有

毒藻中分离出能独立产 PSP 的 *maraxella* 细菌, 但是产毒量低^[9-10]。此后, 许多学者相继从产毒亚历山大藻中分离到能独立产 PSP 的细菌但它们的产毒能力较低, 且毒素组成与有毒藻也不尽相同^[11-12]。

除自主产毒外, 海洋共生细菌也可以影响有毒藻的产毒能力^[13]。因此一些学者试图获得无菌藻来探讨 PSP 的来源。Doucette 等采用溶菌酶和十二烷基硫酸钠 (SDS) 作为除菌剂获得无菌亚历山大藻 (*A. lusitanicum*) 结果发现 除菌后藻类产 PSP 的能力下降了大约 50%, 而加入产毒细菌 (*P. stutzeri*) 后藻的产毒能力

《环境科学与技术》编辑部 (网址) <http://hjks.chinajournal.net.cn> (电话) 027-87643502 (电子信箱) hjksxyjs@126.com

收稿日期 2010-08-22, 修回 2010-09-22

基金项目 福建省科技计划项目资助 (200610025)

作者简介 潘莉莉 (1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境健康与蛋白质组学等 (电话) 0592-2188632 (电子信箱) duoer0592@yahoo.cn * 通讯作

者 (电话) 0592-2186016 (电子信箱) dzwang@xmu.edu.cn

基本恢复^[5]。而多数研究采用抗生素来作为除菌剂, Bates 等研究发现经抗生素处理得到的几株可产记忆缺失性贝毒(ASP)中软骨藻酸(*Domoic acid*)的无菌尖刺拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia pungens*)同自然带菌藻相比,藻细胞生长正常,但产毒能力却下降 8~10 倍^[14]。Uribe 等 2003 年用青霉素和庆大霉素处理过的无菌链状亚历山大藻,产毒能力仅为带菌藻的 1/5,毒素分析后发现 STX 和 GTX₁ 均减少,但 NeoSTX 未减少^[15]。然而,抗生素对藻产毒的影响不尽一致,另有研究表明经过抗生素处理的无菌藻株仍可以生产 PSP 毒素,且产量较含菌藻高^[16-19]。

此外,有研究表明营养盐也会影响藻产毒,尽管麻痹性贝毒分子中并不含有磷元素,但培养液中的磷限制却显著促进毒素的合成^[3, 20]。PSP 究竟是由甲藻本身产生还是由甲藻内的共生细菌产生有待于进一步验证。为了研究 PSP 来源,很多学者使用混合抗生素来试图获得无菌藻以排除藻共生细菌的干扰,但由于每种抗生素杀菌作用机理的不同和在某种程度上存在特异的藻-菌相互作用关系,使得结果分析存在一定困难。而本论文研究两种常用抗生素(氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)和新霉素(Neomycin, Nm))分别对亚历山大藻 *A. tamarense* CI01 的生长和产毒的影响,同时更侧重于高浓度的抗生素对甲藻的影响,旨在为有毒藻产毒机理、藻-菌相互作用等方面的研究工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

研究用的藻种塔玛亚历山大藻 *A. tamarense* CI01 由厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室海洋微生物保种中心(CCMBA)提供。*A. tamarense* CI01 的保存采用 K-medium 培养基^[21]。保种条件:温度 20 °C,盐度值 33,光照强度 4 000 lx 和光暗周期 14 h : 10 h,保种用海水取自厦门港。

1.2 试剂

研究所用抗生素和毒素分析采用的离子对试剂庚基磺酸钠均购自 Sigma 公司,磷酸四丁基铵购自 Fluka 公司,乙腈为 Merck 公司生产的色谱纯试剂,其它试剂均为分析纯试剂。实验中的水为经 Millipore 超纯水系统生产的超纯水。标准毒素 C₁₂ 购自加拿大国立研究院(National Research Council)海洋生物研究所。

1.3 方法

1.3.1 藻的培养和取样

培养藻种初始细胞密度大约在 2 000 cells/mL,

按设定的浓度梯度分别加入不同种类和不同浓度的抗生素,培养 10 d。

每天定时取 1 mL 的样品用于细胞计数。同时取 10 mL 的藻液 9 000×g 离心 10 min,收集后加入 0.5 mL 50 mmol/L 的醋酸溶液进行悬浮,各两个平行样。所收集的样品保存在-20 °C 冰箱中,用于毒素提取和分析。

1.3.2 藻细胞计数

取 1 mL 的藻液,加 0.02 mL 的 Lugol's 固定液固定,取 0.1 mL 混合液铺在浮游植物计数框上,在光学显微镜下进行计数。计数结果取平均值。

1.3.3 藻毒素的提取和分析

A. tamarense CI01 主要生产 C₁、C₂、GTX₂ 和 GTX₃ 毒素,其中以 C₁ 和 C₂ 为主,约占细胞总毒素的 95%,而且 C₂ 是细胞中最主要的 PSP 毒素^[2]。因此本实验用 C₂ 含量变化来反映总毒素的变化趋势。

取上述保存在-20 °C 的藻细胞悬浮液,采用超声破碎仪(Model 450 Branson 公司,美国)破碎细胞,功率 20 W,破碎时间 2 s,间隙 3 s,冰浴冷却。显微镜下检查藻细胞破碎情况,直至样品中的细胞完全破碎为止。然后 12 000×g 离心 30 min,取上清液进行毒素分析(Angillen 1 100 高效液相色谱)。

PSP 的分析采用 Oshima et al.(1989)^[22]建立的,后经 Anderson et al.(1996)^[23]修改的高效液相色谱柱后衍生法。C 类毒素分析用洗脱液为 2 mmol/L 的磷酸四丁基铵溶液(pH6.0),氧化剂均为含有 7 mmol/L 高碘酸的 50 mmol/L 磷酸氢二钾缓冲液(pH9.0)。酸化剂是 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为 0.4 mL/min。柱温是室温,衍生反应温度是 80 °C。

1.3.4 抗生素除菌检验

2216E 固体培养基:15 g 琼脂,蛋白胨 5 g,酵母膏 1 g,磷酸高铁 0.1 g,陈海水 1 000 mL, pH 7.6。

取加入抗生素后第 1、3、5、7、9 天的藻液,稀释到适当浓度(涂布藻液的最佳稀释倍数由预试验确定),0.1 mL 涂布 2216E 琼脂,每种涂布 3 个平板,密封平板,25 °C,14 h : 10 h 弱光照射恒温培养,观察菌落数。

1.3.5 磷酸盐的测定

采用钼蓝分光光度法测定海水中的可溶性磷酸盐^[24]。

2 实验结果与讨论

2.1 Nm 与 Amp 对 *A. tamarense* CI01 细胞生长的影响

由图 1 可以看出,当 Nm 浓度低于 1 000 μg/mL 时对藻细胞的生长没有影响,甚至还有促进作用。同时发现经 Nm 处理的藻细胞有成链现象,以两个细胞形

成的链居多,也有三、四个细胞链,张冬宝等^[25]也报道了这一现象。随着 Nm 浓度的进一步增加(>1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$),与空白对照组相比处理组藻密度的增长速度受到抑制,当处理组浓度增加到 Nm 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时藻密度经过 8 d 的培养后没有增加。图 2 表明 Amp 促进了藻细胞的生长,尽管在高浓度(2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组的培

养前期细胞密度增长速度受到轻微影响。实验中发现低浓度 Amp 处理藻细胞有变小现象,当浓度较高时由于细胞膜与液胞膜的半透性,引起藻细胞壁内外渗透压不一样,细胞液脱水而导致其发生质壁分离现象(如图 3c),浓度增加到 Amp 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,部分藻细胞壁脱落形成原生质体(如图 3d)。

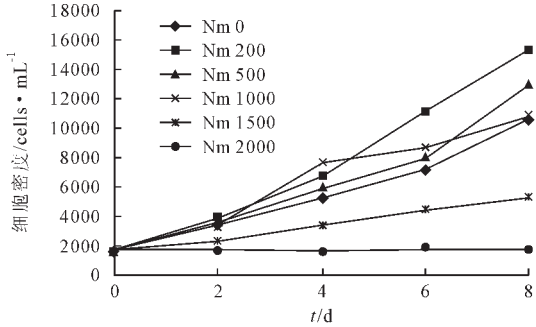


图1 Nm对*A. tamarensis* CI01生长的影响
Fig.1 Effects of Nm on the growth of *A. tamarensis* CI01

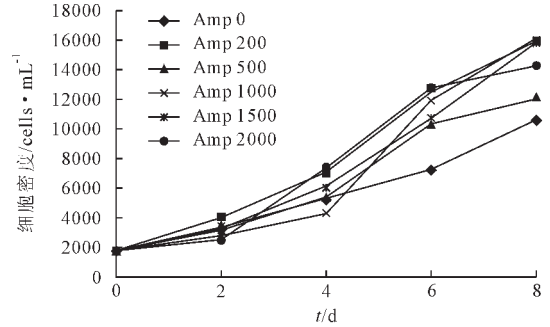


图2 Amp对*A. tamarensis* CI01生长的影响
Fig.2 Effects of Amp on the growth of *A. tamarensis* CI01

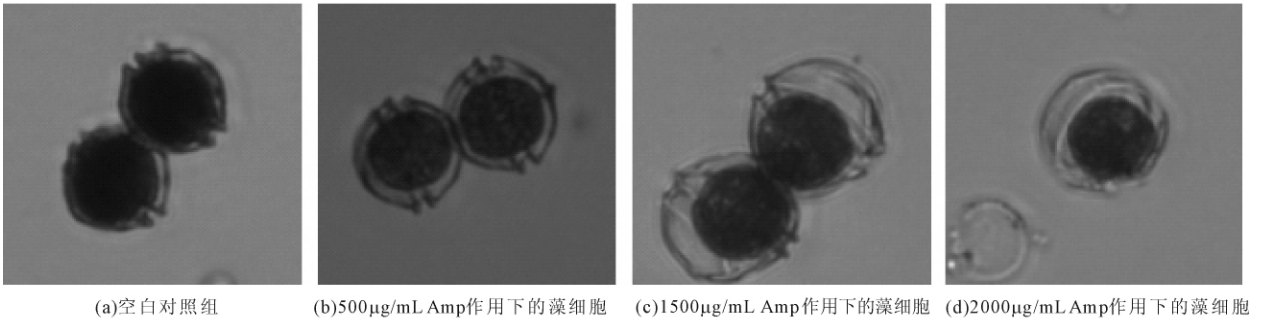


图3 Amp对*A. tamarensis* CI01细胞形态的影响(10×20)
Fig.3 Effects of Amp on cell morphology of *A. tamarensis* CI01

根据上述研究结果,加入 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 后,虽然 *A. tamarensis* CI01 藻细胞与空白对照组相比出现严重的质壁分离现象,但还是能促进藻的生长。同时 1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nm 是实验中不使藻致死的最大浓度,因此选定 1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nm 和 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 作为进一步研究的浓度来研究藻体内毒素是否受到影响,同时监测藻液中细菌密度变化和磷酸盐浓度变化。

2.2 Nm 与 Amp 对 *A. tamarensis* CI01 产毒的影响

从图 4 能更明显的看出加入 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 和

1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nm 后的藻细胞经过长短不一的潜伏期后才进入指数生长期,2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 虽然导致一些藻细胞发生了质壁分离现象,但并没有影响到藻细胞的最高密度。

藻液中细菌密度变化(图 5):空白对照组藻液中的细菌密度在培养初期由于新鲜培养基提供足够的营养迅速增加,当藻处于指数生长期时由于藻分裂生长快和细菌竞争营养导致细菌密度下降,而当藻处于平稳期时,一些藻细胞死亡又给细菌带来了营养,细菌开始大量繁殖。而抗生素处理组的藻液中由于抗生素杀菌作用细菌数量较少(在图中几乎和 X 轴平行)。由于 Nm 和 Amp 的杀菌机理不同,Nm 是由新霉素链霉菌(*Streptomyces fradiae*)产生的氨基糖苷类抗生素,主要与细菌核糖体 30s 亚基结合,抑制细菌合成蛋白质。对 G⁺和 G⁻均有抑制作用。Amp 作用机理是破坏细菌细胞壁四肽侧链和五肽桥的结合而阻碍细胞壁合成而发挥杀菌作用,对 G⁺有效,对 G⁻作用不大^[26]。在实验中也发现同浓度下 Amp 没有 Nm 的杀菌作用效果好。

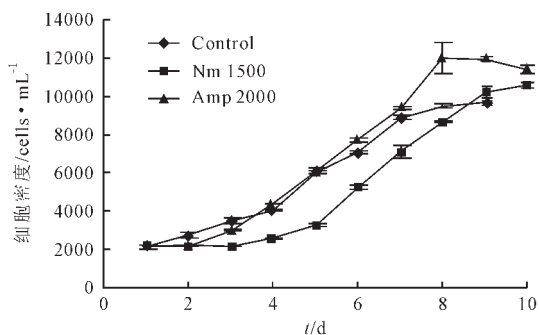


图4 抗生素对*A. tamarensis* CI01生长的影响
Fig.4 Effects of antibiotics on the growth of *A. tamarensis* CI01

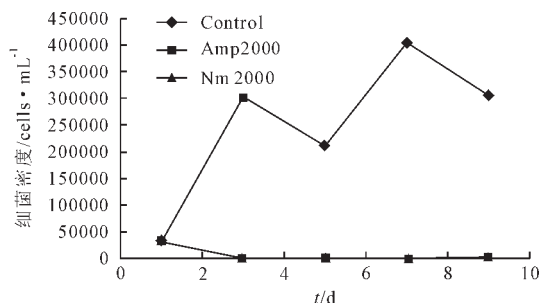


图5 加入抗生素后培养液中细菌密度的变化
Fig.5 Variations of bacteria density in the culture media with Nm or Amp

株藻际共生细菌,但并没有在其内检测出 PSP 毒素,可是不能说明藻液中不存在能产毒的细菌,特定抗生素胁迫下的特定菌株和有毒藻产毒之间的关系还有待于进一步深入研究。

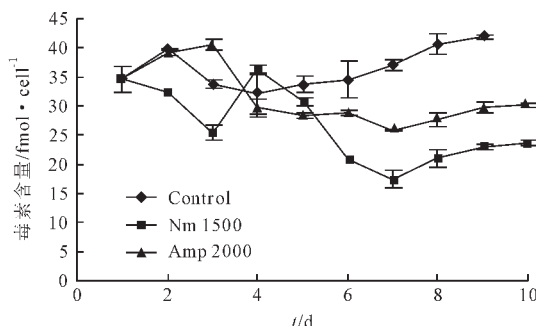


图7 抗生素对 *A. tamarensis* CI01 细胞毒素含量的影响
Fig.7 Effects of antibiotics on toxin content of *A. tamarensis* CI01

从图 6 和图 7 中可以看出,加入抗生素后,从整体趋势看无论是单位水体藻毒素含量还是藻细胞毒素含量都要低于空白对照组,空白对照组在培养的第 9 天细胞中 C_2 含量达到 41.93 fmol/cell,而经 1 500 $\mu\text{g/mL}$ Nm 处理 9 天的 *A. tamarensis* CI01 的细胞中 C_2 含量为 22.93 fmol/cell,经 2000 $\mu\text{g/mL}$ Amp 处理 9 天后的细胞 C_2 含量则为 29.69 fmol/cell,仅为对照组细胞毒素含量的 40%~50%。该结果表明 Nm 和 Amp 能抑制 *A. tamarensis* CI01 细胞中毒素的合成,且 Nm 抑制作用更显著。

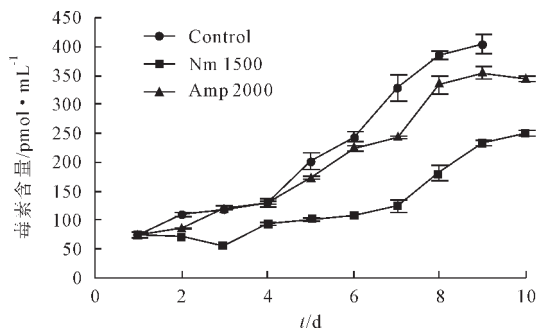


图6 抗生素对 *A. tamarensis* CI01 毒素含量的影响
Fig.6 Effects of antibiotics on toxin yield of *A. tamarensis* CI01

本研究同时检测了藻液中磷酸盐的变化(图 8),经 1 500 $\mu\text{g/mL}$ Nm 处理的 *A. tamarensis* CI01 在加入 Nm 的第 2 天后培养液中的磷酸盐含量有明显升高,而经 2 000 $\mu\text{g/mL}$ Amp 处理过的藻液中磷酸盐含量和空白对照组相比并没有多大变化。导致这一现象的具体原因还不是很清楚,Nm 对藻的胁迫作用使藻细胞生理发生变化,可能影响了细胞内磷酸盐代谢途径,从而导致细胞内磷酸盐的释放。由于 Nm 和 Amp 杀菌机理不同,Amp 处理过的藻液中磷酸盐含量和空白对照组相比并没有多大变化。但是 Amp 处理过的藻液藻细胞会发生质壁分离现象,甚至细胞壁脱落形成原生质体,表明藻细胞生理也发生了变化。藻细胞生理发生变化,有可能影响某些参与毒素合成的酶的活性而影响藻产毒的能力,本实验室也正在利用蛋白质组学的手段来探讨这一问题。

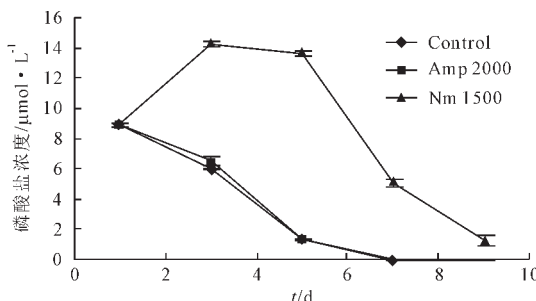


图8 加入抗生素后培养液中磷酸盐浓度的变化
Fig.8 Variations of phosphate concentration in the culture media with antibiotics

结合抗生素的杀菌作用(图 5)和抗生素对藻产毒的影响(图 6 和图 7),可以看出藻细胞毒素含量和细菌存在一定的关系。抗生素加入后,藻培养液中细菌数量急剧下降同时藻产毒能力也降低了。Doucette 等研究发现了某些细菌可以促进藻产毒,产毒细菌(*P. stutzeri*)加入到无菌亚历山大藻(*A. lusitanicum*)后结果发现,藻的产毒能力基本恢复^[5]。笔者认为,抗生素的加入有可能杀死了促进藻产毒的细菌,或者杀死了能产毒的细菌从而导致藻产毒能力下降。同时海洋中也存在能削弱藻产毒细菌,由于每种抗生素和细菌特效性,以及在某种程度上存在的特异的藻-菌相互作用关系^[13],因此有些学者研究经抗生素处理的无菌藻株仍可以生产 PSP 毒素,且产量较含菌藻高^[17-19]。由于并不是所有的藻内共生菌均能在 2216E 营养琼脂平板上生长,本研究在抗生素除菌检验环节中分离出几

综上所述,本研究结果揭示 1 500 $\mu\text{g/mL}$ Nm 和 2 000 $\mu\text{g/mL}$ Amp 加入 *A. tamarensis* CI01 后,抑制或杀死了能产毒或有利于产毒的细菌,或者影响了细胞内参与毒素合成的酶从而干扰毒素的正常合成,而导致藻细胞毒素合成能力降低。同时由于藻际细菌存在一定的特殊性,特定抗生素胁迫下的特定菌株的分离以及其和有毒藻产毒之间的关系还有待于进一步深入研究。

[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] Wang D Z, Hsieh D P H. Dynamics of C₂ toxin and chlorophyll-a formation in the dino flagellate *Alexandrium tamarense* during large scale cultivation[J]. *Toxicon*, 2001, 39: 1533–1536.
- [3] Wang D Z, Hsieh D P H. Effects of different nitrogen/phosphorus nutrient ratios on the growth and C₂ toxin bioproduction in *Alexandrium tamarense* CI01[J]. *Mar Poll Bull*, 2002, 45: 286–289.
- [4] Yoshinaga I, Kawai T, Ishida Y. Lysis of *Gymnodinium nagasakiense* by Marine Bacteria[A]. in Lassus P, Arzul G, Erard E, et al. Harmful Marine Algal Blooms[C]. Paris: Technique et Documentation-Lavoisier Intercept Ltd, 1995: 687–692.
- [5] Doucette G J, Powell C L. Algal-bacterial Interactions Can They Determine the PSP-related Toxicity of Dinoflagellates. Harmful Algae[R]. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, 1998, 406–409.
- [6] Ohta S, Chang T, Ikegami N. Antibiotic substance produced by a newly isolated marine microalga, *Chlorococcum* HS 101[J]. *Bull Environ Content Toxicol*, 1993, 50: 171–178.
- [7] Silva E S. Relationship between Dinoflagellates and Intracellular Bacteria. Maine Algae in Pharmaceutical Science[R]. New York: Walter de Gruyter and Co, 1982, 269–288.
- [8] 林伟, 周名江. 有毒藻产毒过程中海洋细菌的作用[J]. *海洋科学*, 2001, 25(3): 34–38.
Lin W, Zhou M J. Effect of marine bacteria on harmful algal blooms[J]. *Mar Sci* 2001, 25(3): 34–38. (in Chinese)
- [9] Kopp M, Doucette G J, Kodama M, et al. Phylogenetic analysis of selected toxic and non-toxic *Alexandrium tamarense*[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, 24: 251–257.
- [10] Kodama M, Ogata T, Sakamoto S, et al. Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium *Moraxella* sp. isolated from *Protogonyaulax tamarensis*[J]. *Toxicon*, 1990, 28: 707–714.
- [11] Franca S, Viegas S, Mascarenhas V, et al. Prokaryotes in Association with a Toxic *Alexandrium lusitanicum* in culture. Harmful Marine Algal Blooms[R]. Paris: Technique et Documentation-Lavoisier Intercept Ltd., 1995, 44–51.
- [12] Gallacher S, Flynn K J, Leftley J, et al. Bacterial Production of Sodium Channel Blocking Toxins. Harmful and Toxic Algal Blooms[R]. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 1996, 355–358.
- [13] Gregory J, Reguera B Xunta de Galicia. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Harmful Algae [C]. Santiago de Compostela, 1998, 406–409.
- [14] Bates S S, Douglas D J, Doucette G J, et al. Enhancement of domoic acid production by reintroducing bacteria to axenic cultures of the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*[J]. *Nat. Toxins*, 1995, 3: 428–435.
- [15] Uribe P, Espejo R T. Effect of associated bacteria on the growth and toxicity of *Alexandrium catenella*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 659–662.
- [16] Wang Chang-hai, Alvin Y T Ho, et al. Antibiotic treatment enhances C₂ toxin production by *Alexandrium tamarense* in batch cultures[J]. *Harmful Algae* 2004, 3: 21–28.
- [17] Dantzer W R, Levin R E. Bacterial influence on the production of paralytic toxins by dinoflagellate algae[J]. *Appl Microbiol*, 1997, 83: 464–469.
- [18] Bocazr B A, Beitler M K, Liston J, et al. Paralytic shellfish toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture[J]. *Plant Physiol*, 1988, 88: 1285–1290.
- [19] David H G, Lyndon E L, Andrew P N, et al. Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*[J]. *Microbiology Ecology*, 2004, 47: 345–357.
- [20] Matsuda A, Nishijima T T, Fukami K et al. Growth kinetics and paralytic shellfish poisoning toxin production in phosphorus-limited cultures of *Alexandrium catenella* [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2006, 72 (2): 193–200.
- [21] Keller M D, Selvin R C, Claus W, et al. Media for the culture of oceanic ultra phytoplankton[J]. *Phycology*, 1987, 23: 633–688.
- [22] Oshima Y, Sugino K, Yasumoto T. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins[J]. *Mycotoxins and phycotoxins*, 1989, 319–326.
- [23] Anderson D M, Kulis D M, Qi Y Z, et al. Paralytic shellfish poisoning in Southern China[J]. *Toxicon*, 1996, 34: 579–590.
- [24] Murphy J, Riley J P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1962, 27: 31–36.
- [25] 张冬宝, 隋正红, 茅云翔, 等. 8种抗生素对塔玛亚历山大藻生长的影响[J]. *海洋学报* 2007, 2: 123–130.
Zhang Dong-bao, Sui Zheng-hong, Mao Yun-xiang, et al. Study on the sensitivities of eight antibiotics on *AlexandriumG tamarense* (Lebour) Balech [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 2: 123–130. (in Chinese)
- [26] Waksman S A, Lechevalier H A. Neomycin. A new antibiotic active against streptomycin resistant bacteria, including tuberculosis organisms[J]. *Science*, 1949, 109(25): 305–307.