

# 大亚湾水域两种拟菱形藻的 形态学鉴定及毒素分析

邢小丽<sup>1</sup>, 杨军霞<sup>1</sup>, 康燕玉<sup>2</sup>, 高亚辉<sup>1</sup>, 梁君荣<sup>1</sup>, 林旭吟<sup>3</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005 2. 厦门市农产品质量安全检验检测中心, 福建 厦门 361009 3. 厦门海洋职业技术学院, 福建 厦门 361012)

**摘要:** 对 2005 年分离自广东大亚湾的两种潜在产毒拟菱形藻进行了形态学观察和毒性分析. 通过透射电子显微镜 (TEM) 观察确认藻种为细弱拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia cuspidata*) 和多纹拟菱形藻 (*P. multistriata*). 采用高效液相色谱法 (HPLC) 对这两种藻的常规培养样进行软骨藻酸毒素检测, 结果均未检测到软骨藻酸. 鉴于以上两种拟菱形藻存在着潜在产毒特性, 不同培养条件的诱导实验尚需继续.

**关键词:** 拟菱形藻; 透射电子显微镜; 软骨藻酸; 高效液相色谱

中图分类号: Q949.27

文献标识码: A

文章编号: 1000-8160(2007)04-0576-07

1987年加拿大爱德华王子岛东海岸发生因食用紫贻贝而造成的中毒死亡事件, 造成 100 多人中毒, 3 人死亡. 中毒者主要表现为腹痛、腹泻、呕吐, 并伴有严重的头痛、记忆丧失、意识混乱、昏迷等症状. 其中 12 人病愈后记忆丧失长达 18 个月之久, 因此称之为记忆丧失性贝类中毒 (amnesic shellfish poisoning ASP). 后经加拿大国立大西洋研究中心的专家们鉴定, 发现中毒物质为由多列拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia multiseries*) 产生的软骨藻酸 (domoic acid). 此后, 在加拿大、美国海岸拟菱形藻产生软骨藻酸而引起危害事件不断被报道<sup>[1]</sup>.

到目前为止, 拟菱形藻属已有 12 种被报道可产生软骨藻酸<sup>[2-4]</sup>, 其中澳洲拟菱形藻 (*P. australis*)、成列拟菱形藻 (*P. seriata*) 与多列拟菱形藻 (*P. multiseries*) 的产毒性已得到广泛的认可. 而其他 9 种: 靓纹拟菱形藻 (*P. calliantha*)、细弱拟菱形藻 (*P. cuspidata*)、拟柔弱拟菱形藻 (*P. pseudodelicatissima*)、多纹拟菱形藻 (*P. multistriata*)、尖刺拟菱形藻 (*P. pungens*)、柔弱拟菱形藻 (*P. delicatissima*)、*P. fraudulenta*、*P. turgidula* 和 *P. galaxiae* 的毒性在不同地域则表现不同.

拟菱形藻也同样广泛分布于我国沿海, 到目前为止, 自南到北已报道的拟菱形藻有澳洲拟菱形藻、细弱拟菱形藻、柔弱拟菱形藻、多列拟菱形藻、多纹拟菱形藻、尖刺拟菱形藻、拟柔弱拟菱形藻、成列拟菱形藻、中华拟菱形藻、*P. subpacifica*、*P. subfraudulenta*、*P. turgidula* 共 12 种<sup>[5,6]</sup>. 其中有 9 种是潜在产毒种, 在非中国海区均有产毒报道, 它们是: 澳洲拟菱形藻、细弱拟菱形藻、柔弱拟菱形藻、多列拟菱形藻、多纹拟菱形藻、尖刺拟菱形藻、拟柔弱拟菱形藻、成列拟菱形藻、*P. turgidula*<sup>[5,6]</sup>. 虽然陈西平等 (2001) 检测到我国渤海等海域部分海产品中存在低浓度的软骨藻酸<sup>[7]</sup>, 李大志等 (2002) 也报道大连海域黑石礁省区的扇贝受到了软骨藻酸的

收稿日期: 2006-12-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40676080); 国家重点基础研究发展规划项目 (2005CB422305)

作者简介: 邢小丽 (1979~), 女, 博士研究生.

通讯作者: 梁君荣, 女, 讲师; E-mail: sunlj@xmu.edu.cn

污染<sup>[8]</sup>,但是到目前为止,尚无关于中国海域拟菱形藻产生软骨藻酸的直接相关报道.那么分布在我国海域的潜在产毒拟菱形藻是否会产毒?在何种情况下产毒?这都需要我们进行相关工作来进一步阐明.

最早用于检测软骨藻酸的方法是依据 AOAC 确立的小鼠生物法<sup>[9]</sup>.该方法对软骨藻酸的检测下限约为  $40\mu\text{g/g}$ .虽然方法简单易行,但检测的精确度不高.而高效液相色谱法 (HPLC) 由于其灵敏度高,最低检测下限可达到  $0.3\sim 10\text{ng}$  得到了广泛的认可和应用.因此,本文对分离自我国广东大亚湾的两种潜在产毒拟菱形藻(即:细弱拟菱形藻和多纹拟菱形藻)在实验室常规条件下培养,选用 HPLC 方法检测其产毒的可能性.

## 1 材料和方法

### 1.1 藻株的培养

实验藻株:细弱拟菱形藻(厦门大学硅藻实验室藻种库株系号 MM DL547,下同)与多纹拟菱形藻(MMDL548)均于 2005 年 11 月分离自广东大亚湾.

培养条件:在  $1000\text{cm}^3$  三角瓶中盛  $800\text{cm}^3 f/2$  培养基培养.海水采自厦门港,用  $0.45\mu\text{m}$  滤膜过滤,高压灭菌后加入  $f/2$  母液配成  $f/2$  培养基.培养基盐度:29 培养温度:  $20^\circ\text{C}$ ,光照强度:  $5000\text{lx}$  光周期:暗周期 = 12:12(h).

接种:取处于指数生长期的藻液,按藻液:培养基 = 1:30 的比例进行接种,细胞起始浓度约为  $1\times 10^4$  个 /  $\text{cm}^3$ .

### 1.2 形态学观察

采用光学显微镜 (LM) 和透射电子显微镜 (TEM) 观察毒素检测前的拟菱形藻的形态特征.其中 TEM 观察的样品处理方法为:取  $5\text{cm}^3$  的藻液,加入等体积浓硫酸,  $100^\circ\text{C}$  水浴 20min 用蒸馏水多次水洗至中性.取  $10\text{mm}^3$  样品制成铜网,自然晾干或在白炽灯下烘干后置于 JEM 2100 TEM 下观察拍照.

### 1.3 高效液相色谱法检测藻毒素

1.3.1 样品预处理 藻细胞及培养液的收集:从藻种扩大培养第 2 天起,隔天取藻液  $15\text{cm}^3$ ,至衰败为止.藻液经  $0.45\mu\text{m}$  孔径滤膜过滤,收集滤液.同时将留在滤膜上的藻细胞用  $5\text{cm}^3$  灭菌海水将其从滤膜上转移到  $10\text{cm}^3$  离心管中(离心管事先用酸浸泡过),将滤液和重悬后的藻液  $-20^\circ\text{C}$  条件下保存备用.

藻细胞及培养液的预处理:参考 Vale(2001)的方法<sup>[10]</sup>,将重悬的藻液用直径为  $0.1\text{cm}$  的超声波破碎仪 (virsonic 475) 冰浴破碎 5min 保存的细胞培养液滤液和超声破碎后的混合物经  $0.22\mu\text{m}$  滤膜过滤,取滤液直接进样.

1.3.2 HPLC-DAD 采用 Agilent1100 型高效液相色谱仪(二极管阵列检测器, DAD)对预处理的样品进行软骨藻酸检测.分析方法在 Vale 等(2001)建立的方法上做相应改动.

流动相:水:乙腈:三氟乙酸 = 80:20:0.1;流速:  $0.5\text{cm}^3/\text{min}$ ;柱子:反相 ZORBAX Eclipse XDB-C8( $4.6\text{mm}\times 150\text{mm}$ );检测波长:  $242\text{nm}$ ,波宽:  $10\text{nm}$ .柱温:  $25^\circ\text{C}$ .进样量:  $10\text{mm}^3$ <sup>[10]</sup>.

1.3.3 软骨藻酸标准曲线的建立 用乙腈:水(1:9)混合液将软骨藻酸标准品稀释至浓度为  $0.1\text{mg}/\text{cm}^3$ ,再用流动相将标准品分别配制浓度为  $0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25\mu\text{g}/\text{cm}^3$  的软骨藻酸标准溶液,进行 HPLC 检测,每个样品测定 3 次.以软骨藻酸的质量浓度  $x(\mu\text{g}/\text{cm}^3)$  为横

坐标,以3次测定的软骨藻酸的平均峰面积  $y$  为纵坐标,做出标准曲线.软骨藻酸标准样(纯度  $> 95\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )购自上海生物工程公司.

## 2 结果

### 2.1 形态鉴定

细弱拟菱形藻的细胞间以壳面全长的  $1/3$  连接成链状群体.细胞壳面披针形,从壳面中部向两端逐渐变成尖细,长  $17\sim 55\mu\text{m}$ ,宽  $1.9\sim 3.1\mu\text{m}$ .壳缝强烈偏心,具中央较大船骨点.肋突分布均匀,密度为  $10\mu\text{m}$  内  $19\sim 25$  个.肋纹密度为  $10\mu\text{m}$  内  $35\sim 44$  条.点条纹由一排卵圆形或方形孔组成,每微米  $4\sim 6$  个(图 1 A—D).

多纹拟菱形藻的细胞间以壳面全长的  $1/9$  至  $1/11$  连接成链状群体.壳面外形略呈“S”形,两端分别向相反方向弯曲.壳面长  $23\sim 56\mu\text{m}$ ,宽  $2.5\sim 4\mu\text{m}$ .管壳缝强烈偏心,无中央较大船骨点.点条纹由两排孔纹组成,两条相邻的肋纹基部相连,并于相邻的肋突融合,形成“Y”字形.肋突密度为  $10\mu\text{m}$  内  $23\sim 26$  个,肋纹密度为  $10\mu\text{m}$  内  $37\sim 42$  孔纹密度为每微米  $5\sim 6$  个(图 1 E—H).

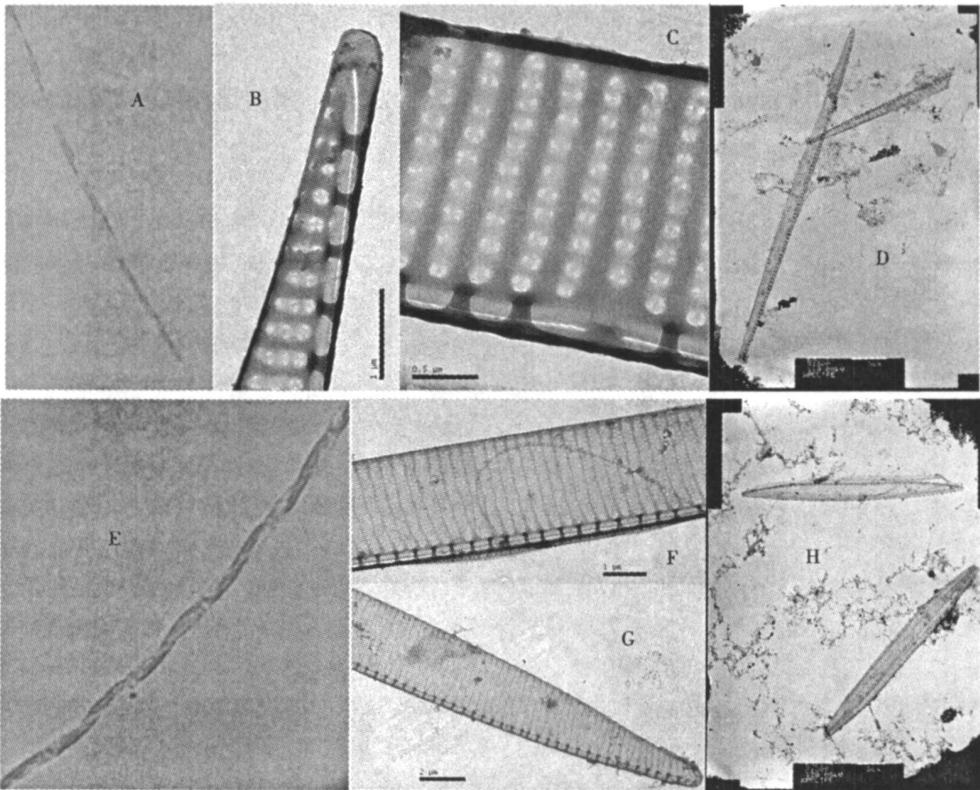


图 1 拟菱形藻的光学显微镜和透射电子显微镜图谱

Fig.1 LM and TEM micrographs of *Pseudo-nitzschia* species

图 A—D: *P.cuspidata* 的光镜、电镜图谱.图 E—H: *P.multistriata* 的光镜、电镜图谱(图 A、E: 光镜,图 B、C、D、F、G、H: 电镜).A、E: 细胞壳面链状结构;B、G: 壳端,标尺: B=  $1\mu\text{m}$ , G=  $2\mu\text{m}$ ; C、F: 中心区,标尺: C=  $0.5\mu\text{m}$ , F=  $1\mu\text{m}$ ; D、H: 细胞壳面观,标尺:  $5\mu\text{m}$

## 2.2 毒素分析

2.2.1 软骨藻酸标准曲线的建立和最低检测限 建立软骨藻酸 HPLC 检测的标准曲线, 如图 2 所示. 结果表明: 软骨藻酸浓度在  $0.1 \sim 25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  时, 其峰面积与质量浓度有良好的线性关系 ( $R^2 = 0.9999$ ), 回归方程为:  $y = 103.25x$ . 本方法的最低检测下限为  $10 \text{ng}/\text{cm}^3$ .

2.2.2 回收率的测定 将浓度为

$0.1 \text{mg}/\text{cm}^3$  软骨藻酸标准品  $0.24 \text{cm}^3$  与  $2.76 \text{cm}^3$  的海水混合进行处理, 按“1.3.1”节的方法进行处理, 共做 6 个平行. 实验证实本方法的回收率为 90.49%. Agilent1100 型高效液相色谱仪的重现性标准偏差为 47.16 本实验方法的重现性标准偏差为 28.49 对藻液的提取方法并未影响对软骨藻酸的分析.

2.2.3 样品检测 软骨藻酸的出峰保留时间为 7.418min(图 3a 所示). 分别对常规培养的细弱拟菱形藻和多纹拟菱形藻进行 HPLC 检测, 发现在预定的保留时间内都未出现样品峰(图 3 b c d). 表明从所检测的样品中未检测出软骨藻酸.

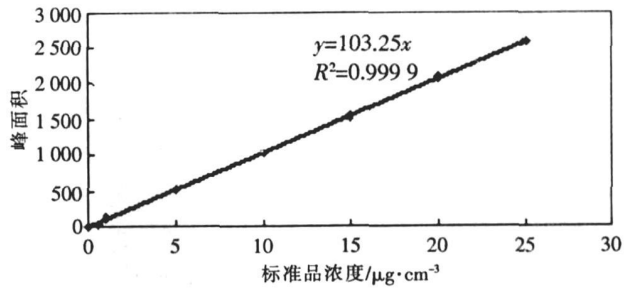


图 2 软骨藻酸标准品 HPLC 标准曲线

Fig. 2 Calibration curve of domoic acid standard

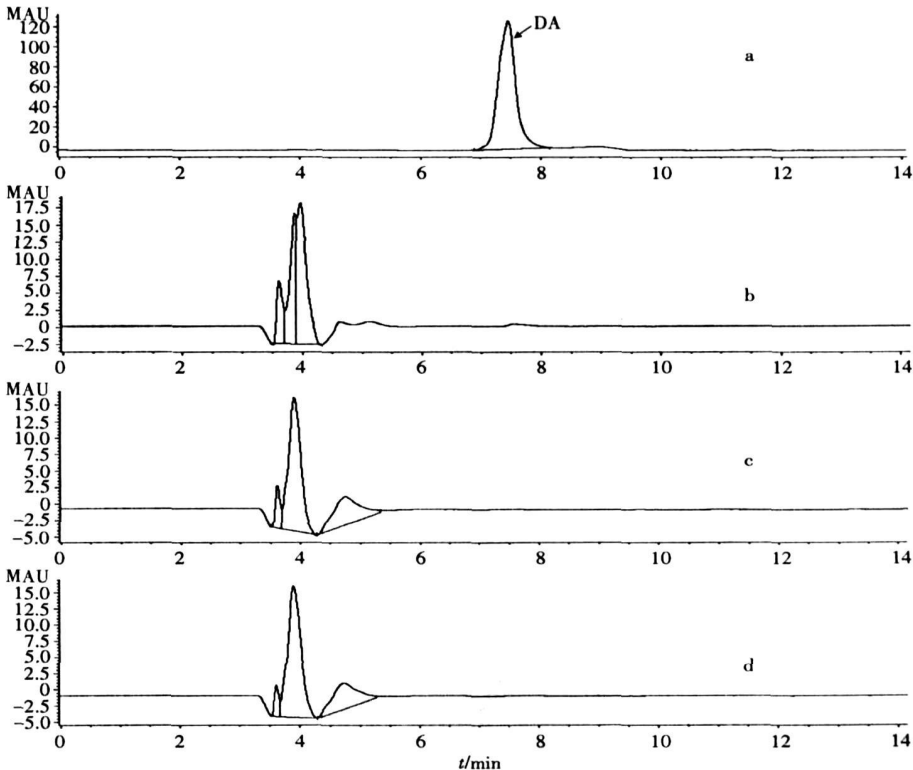


图 3 软骨藻酸 HPLC 分析图谱

Fig.3 HPLC analysis for domoic acid

a: 软骨藻酸标准峰(浓度:  $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ); b: 海水处理对照; c: 细弱拟菱形藻常规培养提取样; d: 多纹拟菱形藻常规培养提取样

### 3 讨论

拟菱形藻的产毒能力是一个比较复杂的情况. 报道过的有毒拟菱形藻并非一定会产生软骨藻酸. 大部分产毒拟菱形藻都具有产毒株和无毒株两种. 营养盐(如磷、硅等)、光周期、盐度等条件的变化都可能对有毒拟菱形藻的产毒能力产生影响. Fehling等(2005, 2004)证实, 有毒种成列拟菱形藻在磷、硅缺陷条件下和长的光周期条件下(光:暗 = 18:6), 会产生更多的软骨藻酸<sup>[11, 12]</sup>. Thessen等(2005)指出, 由食用产自高盐度海区牡蛎而引发的记忆缺失性贝毒(ASP)事件远多于低盐度海区<sup>[13]</sup>. Bates等(1998)认为, 氮不仅是藻细胞生长的必需元素, 同时还是软骨藻酸合成的必需元素<sup>[14]</sup>. 软骨藻酸可能是微量金属元素(如铁、铜)的螯合物, 所以它的产生可能和海水中的铁和铜离子的浓度密切相关<sup>[15]</sup>. 培养于铁充足环境中的多列拟菱形藻比在缺铁环境生长可产生较多的软骨藻酸, 而铜的情况刚好相反<sup>[16]</sup>.

虽然目前尚无关于中国海域拟菱形藻产生软骨藻酸的直接相关报道, 但是已有学者发现我国渤海和大连等海域的海产品中存在低浓度的软骨藻酸<sup>[7, 8]</sup>. 这提示我国海区的拟菱形藻有可能产生软骨藻酸.

我们所分析的细弱拟菱形藻和多纹拟菱形藻在国外都已有相关产毒报道<sup>[3, 17]</sup>. 但是, 本文对实验室培养的这两种潜在产毒拟菱形藻在 HPLC 检测限度内没有检测到软骨藻酸的产生, 其可能的原因有:

(1) 大亚湾水域分离得到的这两种拟菱形藻不产生软骨藻酸. 但在我国其他海区已发现的贝类体内存在软骨藻酸, 而中国南海海域为赤潮高发区, 此水域分布的拟菱形藻种类和数量非常丰富, 因此可能存在尚未被检测到的产毒拟菱形藻. 所以我们还需进一步的分离、培养及检测等相关工作来作进一步判断.

(2) 这两种拟菱形藻可能需要一定条件的诱导才能产生软骨藻酸. 我们所分析只是在常规培养条件下. 因此, 我们将进一步改变营养盐、光照、温度等其他条件进行探讨.

(3) 拟菱形藻在实验室培养条件下的产毒能力与其在自然海区的产毒能力存在着差别. 实验室培养条件可能会抑制其产生软骨藻酸. Bates指出, 有性生殖产生的较大的新细胞较个体小、分裂多次的细胞可产生更多的软骨藻酸<sup>[18]</sup>. 我们发现, 拟菱形藻在实验室培养一段时间后, 藻体细胞会发生变形, 细胞变小, 成链现象消失. 且培养的时间越长, 藻体变形就越严重, 最终会导致死亡. 这提示藻细胞在实验室培养条件下处于的生长状态也可能影响其产毒能力.

上述原因都仅仅只是推测, 我们正在进行相关的工作, 以验证和进一步探讨中国南海及东海海域拟菱形藻的产毒情况.

#### 参考文献:

- [1] 虞秋波, 高亚辉. 拟菱形藻软骨藻酸研究进展 [J]. 海洋科学, 2003, 27(8): 26~29.
- [2] Cerino F, Orsini L, Samo D, et al. The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae* [J]. *Harmful Algae*, 2005, 4: 33~48.
- [3] Fehling J, Green DH, Davidson K. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Scottish waters [J]. *J Phycol*, 2004, 40: 622~630.
- [4] Lundholm N, Moestrup Q, Hasle GR, et al. A study of the *P. pseudodelicatissima/aspida tu* complex (Bacillariophyceae): what is *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*? [J] *J Phycol*, 2003, 39: 797~813.

- [ 5 ] 钱宏林, 梁松, 齐雨藻. 广东沿海赤潮的特点及成因研究 [ J ]. 生态科学, 2000, 19(3): 8~ 17.
- [ 6 ] Yang Z B, Hodgkiss I J. Potentially harmful *Pseudo-nitzschia* species in Hong Kong coastal waters [ A ]. Ho K C, Lin H Y, Yu Z X, *et al*. **Prevention and Management of Harmful Algal Blooms in the South China Sea** [ C ]. Hong Kong: AOHABSCS, 2002: 123~ 128.
- [ 7 ] 陈西平, 王成斌, 胡俊明, 等. HPLC方法检测水及水生动物中软骨藻酸 [ J ]. 卫生研究, 2001, 30(4): 247~ 248.
- [ 8 ] 李大志, 祝文君, 宋文斌, 等. 记忆缺失性贝类毒素的主要成分——软骨藻酸的毛细管电泳分析 [ J ]. 色谱, 2002, 20(2): 125~ 128.
- [ 9 ] Lawrence J F, Charbonneau C, Minard C. Liquid chromatographic determination of domoic acid in mussels using AOAC paralytic shellfish poison extraction procedure collaborative study [ J ]. **J Assoc Offic Anal Chem** 1991, 74: 68~ 72.
- [ 10 ] Vale P, Sampayo M A M. Domoic acid in Portuguese shellfish and fish [ J ]. **Toxicon**, 2001, 39: 893~ 904.
- [ 11 ] Fehling J, Davidson K, Bates S S. Growth dynamics of non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima* and toxic *P. seriata* (Bacillariophyceae) under simulated spring and summer photoperiods [ J ]. **Harmful Algae**, 2005, 4: 763~ 769.
- [ 12 ] Fehling J, Davidson K, Bokh C J, *et al*. Growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) under phosphate and silicate limitation [ J ]. **J Phycol**, 2004, 40: 674~ 683.
- [ 13 ] Thessen A E, Dortch Q, Parsons M L, *et al*. Effect of salinity on *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) growth and distribution [ J ]. **J Phycol**, 2005, 41: 21~ 29.
- [ 14 ] Bates S S, Garrison D L, Homer R A. Bloom dynamics and physiology of domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species [ A ]. Anderson D M, Campbell A D, Hallegraeff G M. **Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms** [ M ]. Heidelberg: Springer-Verlag, 1998: 267~ 292.
- [ 15 ] Eden R, Bruand K. Domoic acid binds iron and copper: a possible role for the toxin produced by the marine diatom *Pseudo-nitzschia* [ J ]. **Marine Chemistry**, 2001, 76: 127~ 134.
- [ 16 ] Pan Y, Bates S S, Campbell A D. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective [ J ]. **Natural Toxins**, 1998, 6: 127~ 135.
- [ 17 ] Orsini L, Samo D, Procaccini G, *et al*. Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species [ J ]. **Eur J Phycol**, 2002, 37: 247~ 257.
- [ 18 ] Bates S S, Hilt M E, Léger C. Domoic acid toxicity of large new cells of *Pseudo-nitzschia multiseries* resulting from sexual production [ A ]. Martin J L, Haya K. **Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences** 2261 [ R ]. Ottawa: Department of Fisheries and Oceans, 1999: 21~ 26.

# Morphological study and toxic analysis for two *Pseudo-nitzschia* species isolated from Daya Bay

XING Xiao-li<sup>1</sup>, YANG Jun-xia<sup>1</sup>, KANG Yan-yu<sup>2</sup>, GAO Ya-hui<sup>1</sup>, LIANG Jun-rong<sup>1</sup>, LIN Xu-yin<sup>3</sup>

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

2. Xiamen Inspection and Testing Center of Agricultural Product Quantity and Security, Xiamen 361009, China

3. Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361012, China)

**Abstract** In this paper, domoic acid (DA) content was detected by HPLC for two *Pseudo-nitzschia* species isolated from Daya Bay in 2005. Based on the morphological characteristics observed under transmitting electronic microscope (TEM), they were identified as *Pseudo-nitzschia cuspidata* (Halse) Halse and *P. multistriata* (Takano) Takano. These two algal strains were cultured in routine condition *f*/2 medium, 20°C under an irradiance of 5 000 lx in a 12:12 light:dark cycle. The results suggested that no DA was produced by these two strains under the lab culture. However, due to the complexity in DA production among *Pseudo-nitzschia* species and the potential toxic production ability of the above species in other areas of the world, further studies on the toxicity are requested under different growth conditions.

**Key words** *Pseudo-nitzschia*; transmitting electronic microscope (TEM); domoic acid (DA); high performance liquid chromatography (HPLC)

(责任编辑:郭水伙)