

研究简报

## 水华束丝藻 NH-5株产生麻痹性贝毒毒素 几个相关问题的研究

金传荫 何家菀 朱家明 刘永定 宋立荣 朱运芝 郭厚良<sup>1)</sup>

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

<sup>1)</sup>(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

### STUDIES ON SOME PROBLEMS ABOUT PRODUCTION OF PARALYTIC SHELLFISH TOXINS BY *APHANIZOMENON FLOS-AQUAE* NH-5

JIN Chuan-yin HE Jia-wan, ZHU Jia-ming, LIU Yong-ding,

SONG Li-rong, ZHU Yun-zhi and GUO Hou-liang<sup>1)</sup>

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072)

<sup>1)</sup> (School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, 430072)

**关键词:** 水华束丝藻, 麻痹性贝毒毒素, 提取方法

**Key words:** *Aphanizomenon flos-aquae*, Paralytic shellfish toxins, Extraction method

中图分类号: Q949.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2000)01-16

近年来,有害赤潮在我国沿海养殖区发生越来越频繁,对水产养殖业造成的经济损失越来越严重,并且对人类的健康构成了威胁。引起了我国重视,并开始了研究<sup>[1,2]</sup>。有害赤潮所产生的毒素中,麻痹性贝毒毒素在世界范围内分布最广,危害最大,引起人们加倍重视<sup>[3]</sup>。由于麻痹性贝毒毒素在国际间的传送受到了严格限制,而我国处于研究起始阶段,缺乏标准毒素,缺乏易于进行培养的赤潮产毒藻株,给研究工作带来了一定困难。一种能产生麻痹性贝毒毒素的淡水蓝藻水华束丝藻 NH-5 株受到了注意。首先,作者可以从中提取麻痹性贝毒毒素,若加以纯化,即可作为标准毒素,从而解决缺乏标准麻痹性贝毒毒素的问题。其次,对其产毒机制的研究,可借鉴来研究其它有毒赤潮藻产毒的机制问题。第三,从中提取的毒素可作为试验材料,以建立一套适当的鉴定分析麻痹性贝毒的方法。本研究正是基于以上考虑而进行的,研究了水华束丝藻毒素产生与培养时间的关系,改善了提取毒素的方法,研究了其产毒机制。

### 1 材料与方法

1.1 材料 淡水蓝藻水华束丝藻 NH-5株 (*Aphanizomenon flos-aquae* NH-5)是 Carmichael 先生馈赠

收稿日期: 1998-12-02; 修订日期: 1999-08-23

基金项目: \*国家自然科学基金赤潮重大项目: 39790110

作者简介: 金传荫 (1942-), 男, 湖北省武汉市人, 副研究员, 研究方向: 藻类生理生态学。

的。这一蓝藻是 Carmichael 于 1980 年从美国 New Hampshire, Durham 附近的一个小池塘中采集,然后在实验室中分离、纯化、选择而来。这一藻株产生麻痹性贝毒毒素中的 Saxitoxin 及 Neosaxitoxin<sup>[4]</sup>

**1.2 培养** 培养基采用 Mahmood 所采用的 BG-11 培养基<sup>[4]</sup>。配方如下:

试剂	g L <sup>-1</sup>	A <sub>5</sub> (微量元素贮液)	1 mL / L
NaNO <sub>3</sub>	1.5	A <sub>5</sub> 配方:	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.04	试剂	g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.075	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.036	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.81
柠檬酸	0.006	ZnSO <sub>4</sub>	0.222
柠檬酸铁铵	0.006	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.36
EDTA-Na <sub>2</sub>	0.001	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.079
		Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0494

5L 血清瓶,以气泵通空气,每天摇瓶 1 次。培养温度 24~25℃,培养瓶表面光强在培养初期为 70~90μ mol quantum m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>后期 150~200μ mol quantum m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>。离心收获藻细胞。

**1.3 生物检测** 基本上采用 AOAC 小鼠生物检测法,仅改用纯种昆明小鼠(原方法规定用 ICR-Swiss)。18—22g 雄性小鼠。腹腔注射 1mL 适当稀释的受试材料,使小鼠死亡时间为 5~7min,然后根据 Sommer 氏表,确定受试材料的毒性,以小鼠单位 MU 表示。其定义为 15min 使小鼠中毒致死所需的毒素量。

**1.4 毒素抽提** 细胞经离心收获后,加 0.1mol 乙酸,冻融 4 次,然后离心得上清,作为毒素粗提液。对照则经冻融 3 次后,将离心所得沉淀再加适量 0.1mol 乙酸,进行超声处理,直至镜检藻细胞完全破碎。再离心,将上清与冻融后离心所得上清合并。作为毒素粗提液。

另一对照为藻细胞加水,经冻融处理,然后以藻细胞悬浮液作材料,测定毒性。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 实验证实水华束丝藻 NH-5株产生麻痹性贝毒毒素

从小鼠生物检测表现的中毒症状来看,腹腔注射水华束丝藻 NH-5株提取的粗毒素后,小鼠即伏于一处,出现腹式呼吸,最后,出现抽搐,不自主的跳动,接着因呼吸肌麻痹而停止呼吸。15min 以内死亡。这是典型的麻痹性贝毒毒素中毒症候群。这与 Mahmood<sup>[4]</sup>测定水华束丝藻含有麻痹性贝毒毒素 Neosaxitoxin 和 Saxitoxin 的结果是一致的。所以水华束丝藻这种淡水蓝藻适于用来作麻痹性贝毒毒素的起始材料。

### 2.2 产毒高峰期的研究

用生物检测法测定毒性,21d 培养物的毒性为(41.7 ± 3.6)MU / g 鲜藻,而 16d 的培养物则为(19.2 ± 1.05)MU / g 鲜藻。前者毒性明显比后者高,为后者的 2 倍以上。因而应在培养 21d 后收获。

Mahwood & Carmichael<sup>[4]</sup>的实验结果是以 12—15d 的培养物的毒性高。

作者的结果与他们的结果有差异,可能是由于培养条件不完全相同的缘故。例如,作者因当时条件所限,温度只能调到 24—25℃,而他们培养温度为 22—24°。

下一步准备进行更严格的温度、光照及培养时间多因子的对比试验,以获取最佳生长条件详细研究毒素产生的环境因子。

### 2.3 毒素提取方法的改进

Ravn 等<sup>[5]</sup>提出了一种以浮游植物中提取麻痹性贝毒的标准方法。藻细胞离心收获,后加 0.1—0.5mol 乙酸或 0.01mol HCl,冻融 3 次,然后超声处理 5min,再离心收集上清液,作为毒素的粗提物。

作者发现,超声处理会明显增加光合色素的污染,需要增加处理步骤以除去光合色素。Yin<sup>[6]</sup>也发现这一问题。那么,能否免去超声处理这一步骤呢? 试验表明,在冻融 4 次的条件下,即增加一次冻融处理

时,超声处理这一环节,并不能增加水华束丝藻 NH-5 株毒素的提取效率,其结果是,不经超声处理的毒性为  $(15.6 \pm 1.1)$  MU / g 鲜藻,经过超声处理者毒性为  $(15.5 \pm 0.9)$  MU / g 鲜藻,二者没有差别。因此,作者认为,藻细胞经离心收获后,加 0.1–0.5 mol 乙酸或者 0.01 mol HCl,冻融 4 次,离心收集上清液,作为粗毒素提取物,是一种较好的粗毒素提取方法。

当然,本实验所用材料与 Ravn<sup>[5]</sup> 等不同,他们使用的是一种海产有毒赤潮甲藻 *Alexandrium tamarense* clone 27, LFI。

在筛选有毒藻时,常用水为介质,将藻水一起冻融处理,经处理的藻水悬液直接注射小鼠,以测定其是否有毒。本实验表明,这种藻水悬液表达的毒性为  $(13.6 \pm 1.1)$  MU / g 鲜藻,即表达了前二种抽提方法的 87% 左右。作为初步筛选毒藻的方法,有相当的可信度,但测定毒性时不宜采用此法。

## 2.4 关于胞外物的毒性问题

在离心收集藻细胞时,在藻细胞沉淀物上层有一薄层黄色物质沉淀。镜检表明,这是一团团无细胞结构的胞外分泌物。将此层黄色物质彻底刮下,然后用同样提取方法,分别提取藻细胞与胞外物的毒性。结果表明,胞外物的毒性只占总毒性的 3%。因为在刮取时,力求彻底,当然也刮除一部分藻细胞。所以在这 3% 的毒性中,藻细胞还占相当比重,即是说,胞外物的毒性在 3% 以下,可忽略不计,认定为藻细胞含毒。

## 2.5 关于培养物的毒性的问题

每 L 培养物可收获鲜藻 2.5–3.0 g 鲜藻,以培养 21 d 的培养物算,每 g 鲜藻毒性为 42 MU, 1 L 培养物的毒性约为 120 MU 左右。然而 Mahmood 每 L 培养物可收获 72 mg 干的藻粉,每 mg 藻粉的毒性为 8 MU,则每 L 培养物的毒性为  $8 \times 72$ , 约为 580 MU, 是本实验结果 4.8 倍。作者使用昆明小鼠,他们使用 ICR-Swiss 小鼠,小鼠的差别也未必会造成 4.8 倍的差异,是否由于经本实验室长期培养后藻株毒性有所退化? 能否筛选出高毒株? 这一问题尚待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 齐雨藻 钱 锋等, 大鹏湾几种赤潮甲藻的分类学研究 [J] 海洋与湖沼, 1994, 25(2): 206–210
- [2] 林燕棠, 杨美霞, 陈瑞雯等, 广东沿海麻痹性贝毒素的研究 [J] 海洋与湖沼, 1994, 25(2): 220–225
- [3] 于仁诚, 周名江等, 麻痹性贝毒研究进展 [J] 海洋与湖沼, 1998, 29(3): 330–338
- [4] Mahmood NA, Carmichael WW Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 [J], *Toxicon*, 1986, 24(2): 175–186
- [5] Ravn H, Anthoni U, Christophersen C, Nielsen PH & Oshima Y Standardized extraction method for paralytic shellfish toxins in phytoplankton [J] *Journal of Applied Phycology* 1995, 7: 589–594
- [6] Yin Q, Carmichael W W, Evans WR Factors influencing growth and toxin production by cultures of the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont [J], *Journal of Applied Phycology* 1997, 9: 55–63