

微量元素 Fe、Mn、Co 对有毒甲藻生长和产毒的影响

梁计林^{1,2}, 龙丽娟¹, 张偲¹, 吴军¹

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 海南省海洋监测预报中心, 海口 570206)

摘要: 实验通过培养基筛选实验和在此基础上的微量元素 Fe、Mn、Co 正交实验对海南三亚热带珊瑚礁海域有毒甲藻 *Coolia monotis* 的生长和产毒影响进行了初步研究, 以期获得充足的原材料进一步开展毒素化合物的研究。实验结果表明, 在 Erd、f/2、GP 和 K 4 种培养配方中, K 系列培养液更适合于 *C. monotis* 的培养。在以 2K 为基础培养配方的微量元素正交实验中, Fe、Mn 和 Co 3 种微量元素的浓度配比为: Fe: $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Co: $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mn: $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能获得最大的平均生长速率; 而 Fe: $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Co: $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mn: $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下 *C. monotis* 的毒性最强。

关键词: 甲藻门; *Coolia monotis*; 微量元素; 生长速率; 毒性实验

中图分类号: P745; S917.3 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2011)01-0119-05

Influence of trace elements, Fe, Mn, and Co, on growth and toxin-producing of toxic marine dinoflagellate *Coolia monotis*

LIANG Ji-lin^{1,2}, LONG Li-juan¹, ZHANG Si¹, WU Jun¹

(1. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301, China; 2. Graduate University of CAS, Beijing 100049, China; 3. Marine Monitoring and Forecast Center of Hainan Province, Haikou 570206, China)

Abstract: The optimal media was selected by a media choosing experiment on growth of toxic marine dinoflagellate *Coolia monotis* isolated from tropic coral reef waters around Sanya, Hainan Island. Based on the result, the influence of different concentrations of three trace elements, Fe, Mn, and Co, on growth and toxin-producing of *C. monotis* were studied by an orthogonal experiment. Our results show that the optimal media is K series among Erd, f/2, GP, and K media. The maximum average growth rate exhibits under the concentrations of $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Fe, Co, and Mn, respectively. When concentrations were $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Fe, $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Co, and $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Mn, *C. monotis* presented the strongest toxicity.

Key words: Dinoflagellates, *Coolia monotis*, trace elements, growth rate, toxicity test

海洋甲藻是赤潮生物的主要类群之一。许多甲藻能够产生毒素, 这些毒素经贝类和鱼类积累后可通过食物链进入人体, 严重危害食用者的健康, 甚至威胁生命安全。随着大规模赤潮的频繁爆发、海产品食物中毒等危害人类生命安全事件时有发生, 水产品安全及人类生命安全保障问题日益受到重视, 有毒甲藻的毒素成分研究也日益引起各国的关注,

已成为海洋生物活性先导化合物研究中进展最为迅速的领域之一。研究甲藻的生长条件及其产毒机制、调控机理, 不仅在基础生物学研究方面具有十分重要的理论意义; 而且, 从应用角度来看, 深入研究甲藻毒素, 既有利于减少甲藻赤潮与毒素的环境公害, 又可使其结构独特的次生代谢产物为人类所利用, 对保障水产品安全和人类生命安全具有重要的

收稿日期: 2009-04-13; 修订日期: 2010-05-04。刘学东编辑

基金项目: 中科院重要方向性项目(KSCX2-YW-R-093); 海洋公益性行业科研专项经费项目(200705026)

作者简介: 梁计林(1981—), 男, 壮族, 广西柳州市人, 硕博连读研究生, 研究方向为海洋天然产物化学。Tel: 02089023378, E-mail: jinn77@163.com

通信作者: 龙丽娟。E-mail: longlj@scsio.ac.cn

现实意义。

Coolia monotis Meunier 是在世界范围广泛分布的一种海洋附生甲藻,也是南中国海的一种常见甲藻,国内尚未对其进行中文命名。由于存在自然条件下 *C. monotis* 细胞稀少、难以获得纯系及进行大量培养的困难,国内外对其的研究尚未深入,仅有有限的几篇报道。有实验证明 *C. monotis* 可以产生毒素^[1-2],对小鼠有毒害作用,毒素被命名为 Cooliatoxin,但其化学成分、结构类型、产毒规律等尚未见有报道。国内相关报道来自本研究所的工作,但仅对其形态和生长方面有初步研究^[3-4],产毒机制及毒素分析方面的工作尚未开展。本实验室自 1998 年开始自海南三亚热带珊瑚礁水域采集分离 *C. monotis* 细胞,经过多年对该种的分离和驯化培养研究,近年得到稳定的培养株,其主要生活方式为底栖和附生。本实验通过不同浓度的微量元素 Fe、Mn、Co 对 *C. monotis* 的生长和产毒影响实验,研究适合 *C. monotis* 生长的培养配方以及不同培养条件下 *C. monotis* 的产毒机制,以期获得充足的原材料进一步开展毒素化合物的研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 藻种

C. monotis 藻种采自海南三亚热带珊瑚礁水域,经分离、驯化、培养得到纯系,由中国科学院南海海洋研究所林永水研究员进行分类鉴定。藻种保藏于本所广东省海洋药物重点实验室藻种室。

1.1.2 实验动物

C. monotis 毒性实验采用的小鼠为 SPF 级 Balb/C 小鼠,雌雄各半,体重 20g 左右,购自广东省医学动物实验中心。

1.2 实验方法

1.2.1 预培养

把 *C. monotis* 藻液置于培养箱中进行 14 天的条件适应,使原培养液营养成分得到最大程度的消耗,将其对实验可能产生的影响降到最低。培养温度 28℃,光照强度为 3500lx,光照和黑暗比为 12h:12h,海水盐度为 34‰。

1.2.2 基础培养液的选择及接种

选用 f/2、Erd、GP、改良 K 以及 2 倍改良 K 共 5 种海洋微藻培养配方进行基础培养液的选择

实验。

实验分为 5 组,每组 3 个重复。接种前充分摇匀藻液,并用 120 目筛绢进行过滤,避免 *C. monotis* 由于分泌黏液集结而导致的细胞分布不均匀,然后迅速分装到各三角瓶中,每瓶 40mL 藻液,分别加入 75mL 的 f/2、K、2K、Erd、GP 培养液,置于培养箱中进行培养,条件与预培养相同。每天进行计数,初始细胞密度为 7.10×10^3 个·mL⁻¹。

1.2.3 正交实验设计

根据 1.2.2 的实验结果,选择其中最适培养液为基础培养液,选取 Fe、Mn 和 Co 3 种微量元素进行研究。各取 3 个水平,按 L₉(3⁴)正交实验表进行实验设计^[5]。实验共 9 组,每组 3 个平行重复。预处理及培养条件同预培养,每瓶 30mL 藻液加入 100mL 新培养液。初始细胞密度为 7.15×10^3 个·mL⁻¹。

1.2.4 生长测定

每 24h 进行计数。充分摇匀,每瓶在 3 个不同位置各取 50μL 藻液,稀释后采用水滴计数法计数,结果取平均值。绘制生长曲线,根据公式 $K = (\ln N_t - \ln N_0) / t$, 求出藻细胞平均生长率 K (division·d⁻¹), 式中 N_0 为藻细胞的初始密度, N_t 为 t 天后的藻细胞密度, t 为培养天数^[6]。

1.2.5 小鼠急性毒理实验

收获正交培养实验的 9 组藻液进行离心浓缩。每组取藻泥 10g(湿重),参照 Holmes 等^[1]的方法进行小鼠急性毒理实验。先把藻泥浸泡在甲醇中进行超声破碎,甲醇提取液过滤后减压蒸干,所得提取物溶于甲醇:水(9:1),加入正己烷去酯。分层后,甲醇-水部分再用水饱和的正丁醇进行萃取,正丁醇部位减压浓缩后用于毒性测试。对应的小鼠实验共 10 组,每组 4 只,雌雄各半,其中第 10 组为对照组,只注射吐温水溶液。其余 9 组每只小鼠注射含提取物 20mg 的 0.5mL 的 5%吐温 60 水溶液。观察 7×24h,记录小鼠注射后的表征及行为反应,对死亡个体进行解剖观察。

2 结果与分析

2.1 基础培养液的选择

C. monotis 在 2K 培养液中的生长速率和最大密度明显高于其余 4 组,第 16 天达到最大密度,为 1.44×10^5 个·mL⁻¹。到 24d 时,除了 K、2K 组外,其各组均开始处于衰亡期,而 K 组密度明显小于 2K 组(图 1)。

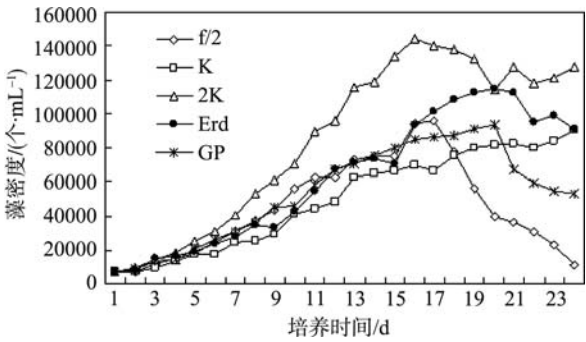


图 1 五种不同培养液条件下的 *C. monotis* 生长曲线
Fig. 1 Growth curve of *C. monotis* under different media.

表 1 *C. monotis* 在不同培养液中培养 16d 时的平均生长速率

Tab. 1 Average growth rate of *C. monotis* in different media on the 16th day

培养配方	f/2	K	2K	Erd	GP
平均生长速率/d ⁻¹	0.153	0.105	0.187	0.138	0.126

表 2 正交实验数据分析表
Tab. 2 Data analysis of the orthogonal test

序号	因素/(mol·L ⁻¹)				生长速率/d ⁻¹
	Fe	Co	Mn	空白	
1	0.000005	0.0000005	0.0000005	1	0.1335
2	0.000005	0.0000001	0.0000002	2	0.1383
3	0.000005	0.0000001	0.0000002	3	0.1563
4	0.000002	0.00000005	0.0000002	3	0.1346
5	0.000002	0.0000001	0.0000002	1	0.1457
6	0.000002	0.0000001	0.0000005	2	0.1578
7	0.00002	0.00000005	0.0000002	2	0.1454
8	0.00002	0.0000001	0.0000005	3	0.1450
9	0.00002	0.0000001	0.0000002	1	0.1541
K1	4.281 × 10 ⁻¹	4.135 × 10 ⁻¹	4.364 × 10 ⁻¹	4.333 × 10 ⁻¹	
K2	4.381 × 10 ⁻¹	4.290 × 10 ⁻¹	4.270 × 10 ⁻¹	4.415 × 10 ⁻¹	
K3	4.445 × 10 ⁻¹	4.682 × 10 ⁻¹	4.352 × 10 ⁻¹	4.359 × 10 ⁻¹	
R	1.639 × 10 ⁻²	5.473 × 10 ⁻²	9.372 × 10 ⁻³	8.129 × 10 ⁻³	

表 3 方差分析表
Tab. 3 Table of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
Fe	4.649 × 10 ⁻⁵	2	2.324 × 10 ⁻⁵	3.711	P > 0.05	
Co	5.311 × 10 ⁻⁴	2	2.656 × 10 ⁻⁴	42.40	0.01 < P < 0.05	*
Mn	2.668 × 10 ⁻⁵	2	1.334 × 10 ⁻⁵	2.130	P > 0.05	
空白	1.253 × 10 ⁻⁵	2	6.263 × 10 ⁻⁶	1.000		

注: $F_{0.95(2,2)}=19.0$; $F_{0.99(2,2)}=99.00$ 。

2.3 小鼠急性毒性实验

方法见 1.2.5, 结果如表 4 所示。以 2K 配方为基础的微量元素配比在 Fe: $5 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Co: $1 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mn: $2 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 *C. monotis* 具有

取各组实验达到最大密度的时间为 t , 根据公式计算平均生长速率。结果如表 1 所示, $K_{2K} = 0.187$ 为最大, 于是选取 2K 作为微量元素正交实验的基础培养液。

2.2 微量元素正交实验

以 2K 培养液为基础培养液, 选取 Fe、Co 和 Mn 3 种微量元素各 3 个水平观察藻的生长情况。按 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行平行实验(表 2), 对实验结果进行方差分析, 结果见表 3。

直观分析见表 2, 影响程度为 $\text{Co} > \text{Fe} > \text{Mn}$ 。根据表 3 的方差分析, 可看出 Co 的浓度对 *C. monotis* 的平均生长速率影响显著, Fe 和 Mn 的影响不显著, 方差分析的结果与直观分析的结果一致。适合 *C. monotis* 生长的最佳微量元素浓度配比为 Fe: $2 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Co: $1 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mn: $5 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

最强的毒性。24h 内实验 2 组死亡小鼠 1 只; 48h 内实验 2 组剩余 3 只小鼠全部死亡, 实验 3 组死亡小鼠 2 只, 实验 5 组死亡小鼠 1 只。其余组 7d 内无死亡个体。死亡的小鼠濒死时身体僵直, 闭眼, 呼吸衰

弱,死后解剖均未发现内脏有明显的异常改变。除对照组外无异常表现外,其余9组小鼠注射粗提液后全部出现聚群、颤抖、闭眼、懒动等明显异常状况,聚群和颤抖意味着小鼠体温的下降,闭眼、懒动

则说明身体对注射的组分有不适应反应,这些症状均证明了毒性的存在。4d后未死亡小鼠的异常现象消失,恢复注射前状态,说明此毒素的引起的负面效应可以通过小鼠自身的代谢机能进行缓解。

表4 *C. monotis* 的小鼠急性毒性实验

Tab. 4 Acute toxicity test of *C. monotis* on mice

死亡时间	死亡数									
	实验1组	实验2组	实验3组	实验4组	实验5组	实验6组	实验7组	实验8组	实验9组	实验10组
1 × 24h	n	1	n	n	n	n	n	n	n	n
2 × 24h	n	3	2	n	1	n	n	n	n	n
7 × 24h	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n

注: n=none

3 讨论

C. monotis 具底栖和附生特性,藻细胞常附着于培养容器的底部和壁部,同时细胞生长过程中还会分泌黏性物质,细胞汇聚成团。接种和计数时产生的剧烈扰动对其生长的危害相当大,会导致细胞的生长受到抑制或死亡,特别是在接种初期以及计数混匀时这种影响更加显著,因此, *C. monotis* 的培养较一些自由游泳的甲藻来说更为困难。有研究表明,微量元素在微藻的生长和代谢产物的积累过程中起着重要作用^[7-12]。本实验研究了适合 *C. monotis* 生长的培养配方,并通过不同浓度的 Fe、Mn、Co 配比对 *C. monotis* 的生长和产毒影响实验,初步研究了不同培养条件下 *C. monotis* 的产毒机制。实验在刘宁宁等^[4]的研究基础上增加了 f/2、Erd、GP 等3种不同培养液配方,结果表明 K 系列培养液为最适宜配方,而 2K 又比 K 更能快速提高其密度,与刘宁宁等的实验结果一致,保种适宜选择 K 培养液,扩大产量应采用 2K 培养液。因此我们选择了 2K 配方作为微量元素正交实验的基础培养液以期获得大量原材料进行 *C. monotis* 的化学成分分析工作。本实验获得的最大细胞密度为 1.44×10^5 个·mL⁻¹,较刘宁宁等的 6.0×10^4 个·mL⁻¹ 有所突破,但如何更进一步提高 *C. monotis* 培养的单位体积细胞密度,仍然需要深入探讨。

国际上常用的藻类毒素检测方法有高效液相检测法^[13]、酶联免疫反应试剂盒检测法^[14]和动物毒理

实验检测法^[15]。高效液相的检测需要昂贵的仪器和标准品,加上复杂的操作过程,并不适于常规的毒素监测;试剂盒方便快捷,但配套仪器、试剂盒也较为昂贵,不适合普及应用;动物毒理实验,直观方便,但无法精确定量,仅能通过对实验动物的观察来判断毒素的有无及毒素类型。对于我们要进行的研究来说,更关键的问题在于前两种方法的应用均需要在毒素的类型和结构已知情况下才能使用,而我们的研究对象即是未确定结构的毒素,因此只能选择动物毒理实验。我们的实验结果表明, *C. monotis* 提取物具有一定的毒性,但未表现出强毒作用。与 Rhodes 等^[2]的工作对比,发现小鼠的中毒症状是相似的,均表现为体温下降并且活力下降。但 Rhodes 等^[2]的实验中出现了注射后 3 和 6min 即致死的急性中毒现象,中毒症状强于我们实验中所观察到的症状。分析原因,可以归结为 3 点: 1) 提取方法的不同,因此提取物的成分、毒素的纯度和含量是有差别的; 2) *C. monotis* 藻种地理品系的不同也可能导致毒素种类和强度的不同; 3) 培养条件上的差异,也会影响到其代谢产物的积累。这个实验结果的对比也提示了我们,甲藻在生长速率快、密度达到最高时其毒素的产量并不一定最高。由于 *C. monotis* 难于大量培养而导致了原材料的不足,这成为系统的化学成分分析工作欠缺的原因,纯的 Cooliatoxin 化合物仍未能得到分离,因此其毒素种类和毒力也不能最终进行精确测定,还需要科学工作者们做进一步的努力。

参考文献

- [1] HOLMES M J, LEWIS R J, JONES A, et al. Cooliatoxin, the first toxin from *Coolia monotis* (Dinophyceae) [J]. Nat Toxins, 1995, 3(5): 355-62.
- [2] RHODES L, ADAMSONA J, SUZUKIB T. Toxic marine

- epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand[J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 2000, 34: 371–383.
- [3] 刘宁宁, 林永水. 有毒甲藻 *Coolia monotis* Meunier 的研究 I. 甲片及细胞形态[J]. 热带海洋, 1999, 18(2): 1–4.
- [4] 刘宁宁, 林永水, 段舜山. 海洋有毒甲藻 *Coolia monotis* 的研究 II. 培养条件的测定[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(1): 64–69.
- [5] 贵州农学院. 生物统计附实验设计[M]. 北京: 农业出版社, 1980: 164–182.
- [6] 陈明耀. 生物饵料培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 42–92.
- [7] WANG D Z, DENNIS P H H. Growth and toxin production in batch cultures of a marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* HK9301 isolated from the South China Sea[J]. Harmful Algae, 2005, 4(2): 401–410.
- [8] PAN Y, CEMBELLA A D, QUILLIAM M A. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*[J]. Marine Biology, 1999, 134(3): 541–549.
- [9] 袁有宪, 曲克明. 海水中痕量金属元素对海洋生物作用研究的进展[J]. 水产学报, 1995, 19(3): 250–257.
- [10] 沈竑, 洪君超, 张开富, 等. 中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)赤潮发生过程中微量元素 Fe、Mn 作用的研究[J]. 暨南大学学报, 1995, 16(1): 131–149.
- [11] 杨晓玲, 郭金耀. 铁对盐藻生长与物质积累的调控作用研究[J]. 水产渔业科学, 2006, 22(10): 476–478.
- [12] 李灏, 缪锦来, 李光友. N、P、Fe、Mn 对亚历山大藻 LC 3 生长的影响[J]. 海洋环境科学, 2006, 25(4): 1–3.
- [13] LEE J S, YANAGI T, KANNA R. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography[J]. Agricultural Biology and Chemistry, 1987, 51: 877–881.
- [14] USAGAWA T, NISHIMURA M, ITOH Y, et al. Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge *halichondria okadaï*[J]. Toxicon, 1989, 27: 1323–1330.
- [15] LEE J S, GARASHI T, FRAGA S, et al. Identification of *Dinophysis furtii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1980, 46: 1405–1411.