

营养环境对微小亚历山大藻C4生长和产毒的影响

王亚军¹, 余新威², 方力², 刘其林¹,
任斌¹, 罗红宇^{1*}

(1. 浙江海洋大学食品与医药学院,

浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室, 浙江 舟山 316022;

2. 浙江省舟山市疾病预防控制中心, 浙江 舟山 316021)

摘要: 为考察营养成分以及培养基基础液再利用对一株微小亚历山大藻的生长和产毒的影响, 采用单因素实验分别研究了氮(NaNO_3)、磷(NaH_2PO_4)、微量元素(FeCl_3 、 Na_2EDTA 、 CuSO_4 、 Na_2MoO_4 、 ZnSO_4 、 CoCl_2 、 MnCl_2)、维生素(Vitamin B_{12} 、Vitamin H、Vitamin B_1)、碳(NaHCO_3)的不同含量以及海水(培养基基础液)利用方式(不循环与循环利用)对微小亚历山大藻C4生长、毒素含量($\mu\text{mol/L}$)与毒素组成的影响。结果显示, 氮、磷浓度对C4藻的毒素总含量($\mu\text{mol/L}$)有显著影响, 其他因素影响均不显著; 氮、磷、碳及微量元素的浓度对GTX1/4(GTX1+GTX4)在总毒素(GTX1+GTX2+GTX3+GTX4)中所占比例均影响显著, 而维生素浓度和海水循环利用对GTX1/4所占比例影响均不明显。氮浓度在0~883 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 毒素含量与氮浓度呈正相关关系, 氮浓度进一步增加, 毒素含量没有明显变化; 磷浓度在0~145.2 $\mu\text{mol/L}$ 范围内增加, 毒素含量先增后降, 最终保持稳定的趋势。最佳的产毒条件为氮883 $\mu\text{mol/L}$, 磷18.15 $\mu\text{mol/L}$, 微量元素为f/2海水培养基中微量元素的0.5倍, 碳不添加。

关键词: 微小亚历山大藻C4; 膝沟藻毒素; 营养因子; 麻痹性贝类毒素

中图分类号: S 968.4

文献标志码: A

微小亚历山大藻C4 (*Alexandrium minutum*) 隶属原生生物界(Protoctista)、甲藻门(Dinoflagellata)、亚历山大藻属(*Alexandrium*), 是一种有甲片的海洋浮游甲藻, 细胞大小为13~30 μm , 分布广泛并且与产麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish toxins, PSTs)赤潮有关。该藻产生的膝沟藻毒素(gonyautoxin, GTX), 已发现有GTX1、GTX2、GTX3、GTX4四种相近的结构(表1), 为一类具有神经毒害作用的生物碱, 其中毒机理为毒素结合钠离子通道, 阻碍钠离子的流动^[1-2]。

膝沟藻毒素经软体动物富集, 最终通过食物链传递给鱼类和人类, 可引起人严重的麻痹性贝类毒素中毒(paralytic shellfish poisoning,

PSP)^[3], 国内已发生多起因食用含麻痹性贝类毒素的织纹螺而导致死亡的事件^[4]。麻痹性贝类毒素也因此受到学者格外的关注。国内目前检测环境和食品中该毒素的标准品均需要从国外进口, 售价昂贵, 制约了国内的相关研究。

已有文献报道, 亚历山大藻属可以用f/2海水培养基(表2)来培养^[5-9], 其中含有氮、磷、微量元素、维生素4类营养素; 氮、磷、铁、铜的含量会对亚历山大藻产毒效果有一定影响^[10-11]; 但关于维生素对产毒的影响却鲜有报道。除f/2培养基中固有的营养因子, 向培养基中添加碳酸氢钠(作为碳源)时可以促进毒素产量^[12]。

为了掌握营养因子和海水再利用对一株微

收稿日期: 2016-09-26 修回日期: 2017-03-10

资助项目: 舟山市科技局一般类海洋项目(2013C31070); 国家星火计划项目(2015GA700094); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目(2015R411059)

通信作者: 罗红宇, E-mail: lisa8919@163.com

表 1 GTX1-4的结构和毒性

Tab. 1 Structures and toxicity of GTX1-4

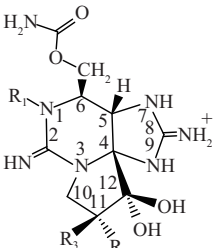
	R1	R2	R3	名称 name	分子量/(g/mol) molecular weigh	毒性/(MU/μmol) toxicity
	OH	OSO ³⁻	H	GTX1	411.4	2468
OH	H	OSO ³⁻	GTX4	411.4	1803	
H	OSO ³⁻	H	GTX2	395.4	892	
H	H	OSO ³⁻	GTX3	395.4	1584	

表 2 f/2海水培养基配方

Tab. 2 Recipe of f/2 medium

成分 component	摩尔浓度/(mol/L) molar concentration
氮 nitrate	NaNO ₃ 8.83×10 ⁻⁴
磷 phosphate	NaH ₂ PO ₄ 3.63×10 ⁻⁵
微量元素 trace element	FeCl ₃ 1×10 ⁻⁵
	Na ₂ EDTA 1×10 ⁻⁵
	CuSO ₄ 4×10 ⁻⁸
	Na ₂ MoO ₄ 3×10 ⁻⁸
	ZnSO ₄ 8×10 ⁻⁸
	CoCl ₂ 5×10 ⁻⁸
	MnCl ₂ 9×10 ⁻⁷
维生素 vitamin	VB ₁₂ 1×10 ⁻¹⁰
	VH 2×10 ⁻⁹
	VB ₁ 3×10 ⁻⁷

小亚历山大藻C4在一次性批量培养中生长、产毒量和毒素组成的影响, 本实验在f/2海水培养基配方的基础上, 考察了氮、磷、微量元素、维生素、碳酸氢钠的浓度对该藻生长和毒素含量的影响, 同时比较了配制培养基的海水类型(自然海水和滤除藻细胞进行再利用的海水)对该藻生长和产毒的影响, 从而确定产毒的最优营养环境, 为后期制备毒素GTX标准品提供高毒素含量的原料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验藻种 微小亚历山大藻C4由暨南大学赤潮与水环境研究中心提供, 保藏在f/2海水培养基^[13]中, 温度24℃, 光强3000~5000 lx, 昼夜时间比12:12。f/2海水培养基的组成配方如

表2所示。

实验设备 GMC-350HP-2人工气候培养箱(上海一恒科学仪器公司); VCX800超声破碎机(美国SONICS&MATERIALS, INC.); Amicon® Ultra-4超滤离心管(Merck Millipore Ltd.); TSQ Vantage三重四极杆质谱仪, 配有电喷雾离子源(ESI源, 美国Thermo公司); Ultimate3000超高效液相色谱仪(美国Thermo公司); Waters ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国Waters公司); Allegra X-15R型高速冷冻离心机(美国Beckman公司)。

实验试剂 膝沟藻毒素标准品(CRM-GTX1&4-C; CRM-GTX2&3-C), 由加拿大海洋生物研究所提供; 维生素H(>98%), 购自TIC(shanghai) Development Co., Ltd; NaNO₃(分析纯)、NaH₂PO₄(分析纯)、微量元素(分析纯)、维生素B₁₂(>95%)、维生素B₁(>98.5%)均购自国药集团化学试剂有限公司。甲酸(LC-MS级)、甲酸铵(LC-MS级)、乙腈(色谱纯)购自德国CNW Technologies GmbH。超纯水由Mili-Q超纯水系统制得。海水采自舟山海域(盐度24)。

1.2 实验方法

f/2海水培养基的配制 海水经0.22 μm纤维膜过滤, 121℃高压灭菌20 min, 按表2的成分和浓度添加营养盐配制而成。

实验培养基及单因素实验设计 每组均以f/2海水培养基为基础, 按表3设计了不同的培养基, 仅改变表3中的某个因素的浓度或改变培养基基础液的类型, 分别进行了6组单因素实验, 每组实验均设3个平行。自然海水指取自舟山海域的天然海水, 再利用海水指培养该藻后, 滤除藻细胞后的海水。

微藻的培养 在超净工作台中, 将处于对数期的微藻(40 000~50 000 个/mL)用灭菌海水

表3 培养基的设计

Tab. 3 Design of medium

梯度 gradient	氮/ ($\mu\text{mol/L}$) nitrate	磷/ ($\mu\text{mol/L}$) phosphate	微量元素 trace element	维生素 vitamin	碳/ ($\mu\text{mol/L}$) carbon	海水类型 sea water style
1	0	0	0	0	0	自然 nature
2	441.5	18.15	1/2 \times	1/2 \times	1766	再利用 reuse
3	883	36.30	1 \times	1 \times	3532	
4	1766	72.60	2 \times	2 \times	5298	
5	3532	145.20	4 \times	4 \times	7064	

注: $n\times$ 指该营养素的浓度为 $f/2$ 培养基中对应营养素浓度的 n 倍, 下同
Notes: $n\times$ stand for n times amount of the corresponding nutrient factor in $f/2$ medium, the same below

调整初始密度为5000个/mL。按每瓶200 mL藻液分装到250 mL的透明三角瓶中, 按表3中设计的浓度添加各营养素, 用带透气孔的海藻培养封口膜将瓶口封好。接种好的微藻置于人工气候培养箱中, 昼夜光照时间比为12:12, 光照强度为 $(125\pm 12.5)\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 温度 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 。

微藻生长密度的测定 在微藻培养过程中, 定期记录海藻细胞密度。计数方法为取1 mL摇匀的藻液于微型离心管中, 加微量鲁格试剂固定后, 涡旋摇匀, 取100 μL 至浮游植物计数板, 于显微镜下计数, 估算出藻密度(个/mL), 并绘制藻密度随时间(d)变化的生长曲线。

毒素的提取 当微藻生长进入对数末期时, 摇匀培养液, 取5 mL置于离心管中, 以 $5000\times g$ 离心15 min, 分离上清液以 $8000\times g$ 再次离心, 合并2次离心的藻泥。藻泥溶解在5 mL 0.003 mol/L HCl和0.01 mol/L CH_3COOH 的溶液中, 冰浴超声破碎5 min后, 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$, $7000\times g$ 离心10 min, 取2 mL上清液, 过截留分子量3000的超滤离心管, $5000\times g$ 离心15 min, 收集滤液, 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存, 待毒素分析。

毒素检测 用0.01 mol/L乙酸溶液稀释毒素标准品, GTX1稀释成浓度0.755、0.302、0.151、0.0755 $\mu\text{mol/L}$, GTX2稀释成浓度1.4275、0.571、0.2855、0.142 75 $\mu\text{mol/L}$, GTX3稀释成浓度0.5425、0.217、0.1085、0.054 25 $\mu\text{mol/L}$, GTX4稀释成浓度0.2463、0.0985、0.049 25、0.024 63 $\mu\text{mol/L}$ 。

标准溶液的毒素浓度用液相色谱串联质谱检测, 色谱、质谱分析条件:

(1) 色谱条件: 流动相A为0.2%甲酸-5 mmol/L 甲酸铵水, 流动相B为乙腈, 流速为0.3 mL/min,

进样量5 μL , 柱温为 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 。分析梯度: 0~0.5 min, 15%A, 85% B; 0.5~4 min, 15%~60%A, 85%~40% B; 4~6 min, 60%A, 40% B; 6~6.2 min, 60%~15%A, 40%~85% B; 6.2~10 min, 15%A, 85% B。

(2) 质谱条件: 质谱采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子扫描方式, 选择反应监测 (SRM) 模式; 喷雾电压为3.0 kV; 汽化温度 $300\text{ }^\circ\text{C}$; 离子传输毛细管温度为 $325\text{ }^\circ\text{C}$; 鞘气压 (sheath units) 为45 arb, 辅助气压 (arbitrary units) 为15 arb, 雾化气均为高纯氮气, 碰撞气为高纯氩气, 压力为1.5 mTorr。GTX1-4的母离子、子离子、透镜电压、碰撞能量的信息见表4。

表4 目标化合物名称、母离子、子离子、透镜电压、碰撞能量

Tab. 4 The name, parent ions, product ions, lens voltage, collision energy of the target compound

化合物 compound	母离子/(m/z) parent ions	子离子/(m/z) product ions	透镜电压/V lens voltage	碰撞能量/eV collision Energy
GTX1	332	314 ^a /236	117	19/23
GTX2	316	298 ^a /220	83	16/25
GTX3	396	316 ^a /298	82	12/18
GTX4	412	332 ^a /314	80	16/16

注: 上标a表示定量离子

Notes: a stand for quantification ion

以毒素响应的峰面积 Y 对毒素浓度 X ($\mu\text{mol/L}$) 进行线性拟合, 绘制标准曲线。

藻提取液的检测条件与毒素标准溶液检测条件相同, 提取液中GTX1、GTX2、GTX3、GTX4的浓度 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 由绘制的标准曲线求得。(若滤液毒素浓度不在线性范围内, 将提取液稀释一定倍数, 使毒素浓度落入线性范围内)。由毒素提取的过程可知单位体积藻液胞内毒素含量等于提取液的毒素浓度。单位体积藻液胞内毒素总含量记作 C_T , 则 $C_T=C_1+C_2+C_3+C_4$ 。

样品中GTX1和GTX4占总毒素的比例 η 按以下公式计算: $\eta(\%)=(C_1+C_4)/C_T\times 100$ 。

1.3 数据处理

每个处理均平行测定3次, 实验结果采用OriginPro 8作图, 利用软件SPSS 17.0对数据进行单因素方差分析和多重比较, 以 $P<0.05$ 作为差异显著。

2 结果

2.1 氮浓度对微小亚历山大藻C4生长和产毒的影响

当不添加氮源时, 藻密度随着时间的延长变化不大; 当氮添加量为441.5~3532.0 μmol/L时, 藻密度随着培养时间的延长而增加(藻密度在氮浓度441.5 μmol/L, 培养至23 d后略有下降)(图1), 因此微小亚历山大藻C4增殖需要添加氮盐。经过23 d培养后, 在0~3532.0 μmol/L范围内, 藻密度大小依次为(11.18±1.58)×10³、(105.80±6.92)×10³、(78.86±5.70)×10³、(83.94±2.46)×10³、(83.16±2.85)×10³个/mL; 经过30 d培养后, 藻密度大小依次为(10.11±1.39)×10³、(101.17±3.43)×10³、(89.86±8.17)×10³、(88.91±1.67)×10³、(90.03±7.90)×10³个/mL。上述数据表明, 在培养后的第23天和

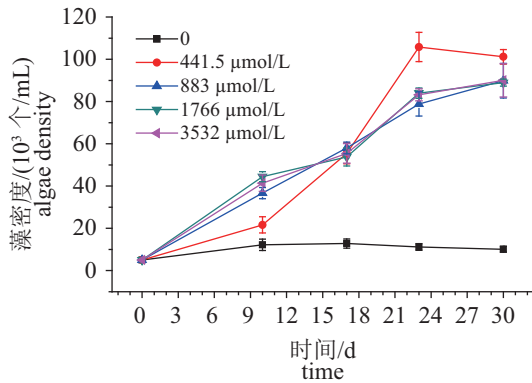


图1 氮浓度对微小亚历山大藻生长的影响

Fig. 1 Effects of nitrate concentration on growth of *A. minutum*

第30天, 氮添加量为441.5 μmol/L时取得藻密度最大值(105.80±6.92)×10³和(101.17±3.43)×10³个/mL, 且均显著高于同期其他氮浓度对应的藻密度值(P<0.05)。说明微小亚历山大藻C4生长的最适的氮浓度为441.5 μmol/L, 即f/2培养基中氮浓度的一半。

在培养第30天后, 检测藻中GTX1~4的含量。结果表明, 初始氮浓度显著地影响产毒量C_T和毒素组成η(F>F_{0.05})(表5)。随着氮浓度的增加, 各毒素的浓度和总毒素浓度C_T逐渐增高, 在氮浓度3532 μmol/L时, C_T达到最大值(5.04±0.33) μmol/L, 显著高于在0~441.5 μmol/L时所对应的总毒素浓度(P<0.05), 但是与883~1766 μmol/L时所对应的总毒素浓度相比并不显著(P>0.05)。4种毒素中以GTX1和GTX4为主, 它们的含量占总毒素的86.17%以上, 特别是藻生长良好的情况下, 其占比达92.1%以上。GTX1/4所占总毒素的比值η在氮浓度0~883 μmol/L范围内随着氮浓度上升而增加, 在氮浓度883~1766 μmol/L范围内随着氮浓度上升而减少, 在氮浓度883 μmol/L处取得最大值94.55%±1.01%, 显著高于在氮浓度883~1766 μmol/L范围内对应的η值(P<0.05)。综上所述, 微小亚历山大藻C4产毒量最大的氮浓度在883~3532 μmol/L, 其中当氮浓度为883 μmol/L(即f/2培养基中氮浓度)时, 主要毒素GTX1和GTX4在总毒素中的比例最高。

2.2 磷浓度对微小亚历山大藻C4生长和产毒的影响

不同的磷浓度对微小亚历山大藻C4生长的影响较为明显(图2), 当不添加磷时, 藻密度随着

表5 氮浓度对微小亚历山大藻毒素含量和组成的影响

Tab. 5 Effects of nitrate concentration on toxin content and constitution of *A. minutum*

参数 parameters	氮浓度/(μmol/L) nitrate concentration					F值 F value
	0	441.5	883	1766	3532	
C ₁ /(μmol/L)	0.09±0.01 ^c	1.09±0.01 ^b	3.06±0.45 ^a	3.22±0.12 ^a	3.24±0.20 ^a	124.45*
C ₂ /(μmol/L)	0.01±0.00 ^d	0.06±0.00 ^e	0.15±0.04 ^b	0.23±0.00 ^a	0.23±0.02 ^a	86.29*
C ₃ /(μmol/L)	0.01±0.00 ^d	0.04±0.00 ^e	0.09±0.02 ^b	0.15±0.01 ^a	0.16±0.00 ^a	173.13*
C ₄ /(μmol/L)	0.04±0.00 ^e	0.40±0.01 ^b	1.19±0.25 ^a	1.31±0.06 ^a	1.40±0.16 ^a	58.96*
C _T /(μmol/L)	0.15±0.01 ^c	1.60±0.01 ^b	4.50±0.72 ^a	4.92±0.13 ^a	5.04±0.33 ^a	114.50*
η/%	86.17±0.64 ^c	93.70±0.19 ^{ab}	94.55±1.01 ^a	92.10±0.30 ^b	92.20±0.53 ^b	24.68*

注: 不同上标的字母表示各组之间的差异显著(P<0.05)。F值带*号表示差异显著(F>F_{0.05}), 下同

Notes: the absolutely different letters in each row mean significant differences (P<0.05). F values with symbol * mean significant differences (F>F_{0.05}), the same below

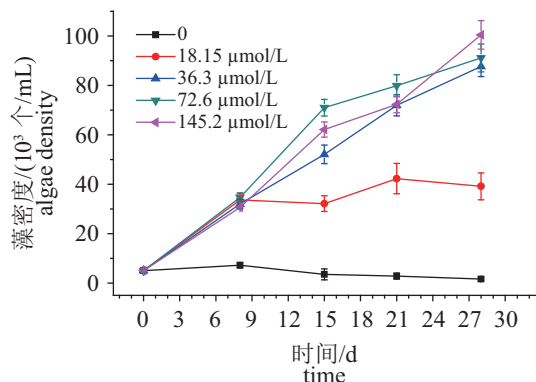


图2 磷浓度对微小亚历山大藻生长的影响

Fig. 2 Effects of phosphorus concentration on growth of *A. minutum*

时间的延长基本保持不变;当添加量为18.15 $\mu\text{mol/L}$ 时,藻密度随着培养时间的延长不断增加,至第8天后基本稳定(33 600~39 140)个/mL;当磷添加量为36.3~145.2 $\mu\text{mol/L}$ 时,在0~28 d内,藻密度随着时间的延长不断增加。设计的5组磷浓度

在实验条件下培养至28 d时,藻密度分别为 $(1.6\pm 0.48)\times 10^3$ 、 $(39.13\pm 5.43)\times 10^3$ 、 $(87.65\pm 4.05)\times 10^3$ 、 $(91.12\pm 5.63)\times 10^3$ 、 $(100.43\pm 5.81)\times 10^3$ 个/mL,藻密度与磷浓度呈现正相关性,磷浓度为145.2 $\mu\text{mol/L}$ 时,藻密度值最大,与其他磷浓度对应的藻密度值差异显著($P<0.05$)。因此,在实验条件下,微小亚历山大藻C4最适生长的磷浓度为145.2 $\mu\text{mol/L}$,即f/2培养基中磷浓度的4倍。

在培养至第28天后,检测藻中GTX1~4的含量。结果表明, C_1 、 C_4 、 C_T 、 η 大小随磷浓度的增加呈现出先升后降、之后趋于稳定的趋势(表6)。磷浓度为18.15 $\mu\text{mol/L}$ 时, C_1 、 C_4 、 C_T 、 η 均取得最大值,分别为 (5.21 ± 0.06) $\mu\text{mol/L}$ 、 (2.47 ± 0.05) $\mu\text{mol/L}$ 、 (7.95 ± 0.02) $\mu\text{mol/L}$ 、 $(96.64\%\pm 0.00\%)$,均显著高于其他磷浓度对应的毒素含量和GTX1/4占比值($P<0.05$)。因此,该微小亚历山大藻C4产毒的最适磷浓度为18.15 $\mu\text{mol/L}$,即f/2培养基中磷浓度的1/2。

表6 磷浓度对微小亚历山大藻毒素含量和组成的影响

Tab. 6 Effects of phosphorus concentration on toxin content and constitution of *A. minutum*

参数 parameters	磷浓度/ $(\mu\text{mol/L})$ phosphorus concentration					F值 F value
	0	18.15	36.3	72.6	145.2	
$C_1/(\mu\text{mol/L})$	0.20 \pm 0.03 ^d	5.21 \pm 0.06 ^a	2.97 \pm 0.06 ^b	2.02 \pm 0.11 ^c	2.01 \pm 0.28 ^c	492.34*
$C_2/(\mu\text{mol/L})$	0.02 \pm 0.01 ^c	0.15 \pm 0.01 ^b	0.15 \pm 0.03 ^b	0.32 \pm 0.07 ^a	0.34 \pm 0.10 ^a	17.91*
$C_3/(\mu\text{mol/L})$	0.01 \pm 0.01 ^c	0.11 \pm 0.00 ^b	0.10 \pm 0.01 ^b	0.17 \pm 0.03 ^a	0.16 \pm 0.05 ^a	21.13*
$C_4/(\mu\text{mol/L})$	0.10 \pm 0.02 ^d	2.47 \pm 0.05 ^a	1.19 \pm 0.02 ^b	0.89 \pm 0.08 ^c	0.91 \pm 0.16 ^c	292.53*
$C_T/(\mu\text{mol/L})$	0.33 \pm 0.06 ^d	7.95 \pm 0.02 ^a	4.40 \pm 0.03 ^b	3.40 \pm 0.28 ^c	3.43 \pm 0.59 ^c	257.08*
$\eta/\%$	91.28 \pm 3.00 ^b	96.64 \pm 0.00 ^a	94.43 \pm 0.80 ^{ab}	85.55 \pm 1.63 ^c	85.62 \pm 1.65 ^c	25.41*

2.3 微量元素浓度对微小亚历山大藻C4生长和产毒的影响

微量元素浓度对微小亚历山大藻的生长有较为明显的影响(图3)。不添加微量元素组在各时期的藻密度均显著小于添加微量元素组($P<0.05$);不添加和添加0.5倍的微量元素时,藻密度随着培养时间的延长而不断升高,第24天时达到最大值,分别为 $(49.60\pm 8.20)\times 10^3$ 和 $(82.47\pm 7.59)\times 10^3$ 个/mL,到第31天时有所下降,分别为 $(40.44\pm 2.97)\times 10^3$ 和 $(71.47\pm 2.61)\times 10^3$ 个/mL,降至最高时的81.5%和86.67%。添加1倍和2倍的微量元素组藻密度随着培养时间的延长不断升高,在第31天时达到最大值 $(90.55\pm 2.86)\times 10^3$ 和 $(82.30\pm 3.32)\times 10^3$ 个/mL。

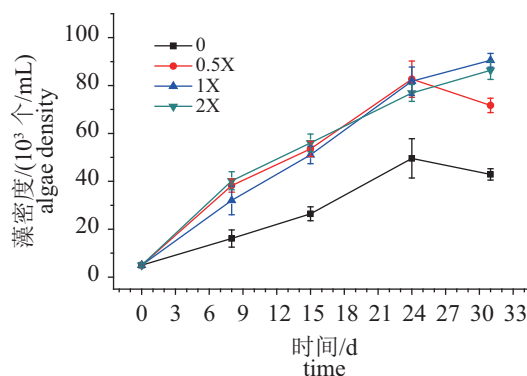


图3 微量元素浓度对微小亚历山大藻生长的影响

Fig. 3 Effects of trace element concentration on growth of *A. minutum*

在培养第31天时, 添加量为1倍微量元素的藻密度较其他添加量对应的藻密度大, 显著高于0倍和0.5倍添加量的藻密度值($P<0.05$), 与2倍添加量的藻密度值差异不明显($P>0.05$)。综上所述, 微量元素的添加可以促进微小亚历山大藻C4的生长, 并且较高的添加量(1倍和2倍添加量)能延缓藻群的衰亡, 生长最佳的添加量为f/2培养基中微量元素浓度的1~2倍。

在培养至第31天后, 检测各组的毒素含量。

结果表明, C_1 、 C_4 、 C_7 随着微量元素添加量的增加均无显著差异($P>0.05$), 而主要毒素占比值 η 在0.5倍的微量元素浓度下达到最大值 $97.17\%\pm 0.00\%$ (表7), 显著高于不添加微量元素组的占比值($P<0.05$), 但是与1倍和2倍添加量条件下的占比值差异不显著($P>0.05$)。说明添加微量元素对微藻产毒含量没有显著影响, 但在0.5~2倍于f/2培养基中的微量元素浓度时, 可以使GTX1/4所占比例提升。

表7 微量元素浓度对微小亚历山大藻毒素含量和组成的影响

Tab. 7 Effects of trace element concentration on toxin content and constitution of *A. minutum*

参数 parameters	微量元素浓度(X) trace element concentration				F值 F value
	0	0.5	1	2	
C_1 ($\mu\text{mol/L}$)	2.95 \pm 0.50 ^a	3.11 \pm 0.25 ^a	3.14 \pm 0.05 ^a	2.76 \pm 0.43 ^a	0.72
C_2 ($\mu\text{mol/L}$)	0.13 \pm 0.01 ^a	0.08 \pm 0.01 ^b	0.09 \pm 0.00 ^b	0.09 \pm 0.02 ^b	12.85*
C_3 ($\mu\text{mol/L}$)	0.07 \pm 0.01 ^a	0.04 \pm 0.00 ^b	0.04 \pm 0.01 ^b	0.04 \pm 0.01 ^b	8.12*
C_4 ($\mu\text{mol/L}$)	1.13 \pm 0.17 ^a	1.19 \pm 0.16 ^a	1.24 \pm 0.05 ^a	1.15 \pm 0.17 ^a	0.34
C_7 ($\mu\text{mol/L}$)	4.28 \pm 0.65 ^a	4.43 \pm 0.40 ^a	4.53 \pm 0.09 ^a	4.05 \pm 0.62 ^a	0.52
η %	95.17 \pm 1.23 ^b	97.17 \pm 0.00 ^a	96.89 \pm 0.11 ^a	96.73 \pm 0.31 ^a	6.00*

2.4 维生素浓度对微小亚历山大藻C4生长和产毒的影响

当维生素浓度为f/2培养基中的0和0.5倍时, 藻密度随着培养时间的延长而升高, 第23天达到最大值, 分别为 $(88.23\pm 5.42)\times 10^3$ 和 $(88.15\pm 2.79)\times 10^3$ 个/mL, 在第30天下降为 $(74.96\pm 3.96)\times 10^3$ 和 $(78.54\pm 4.85)\times 10^3$ 个/mL, 分别降至最高值时的84.96%和89.10%。当维生素添加量为f/2培养基中的1和2倍时, 藻密度随着培养时间的延长而不断升高,

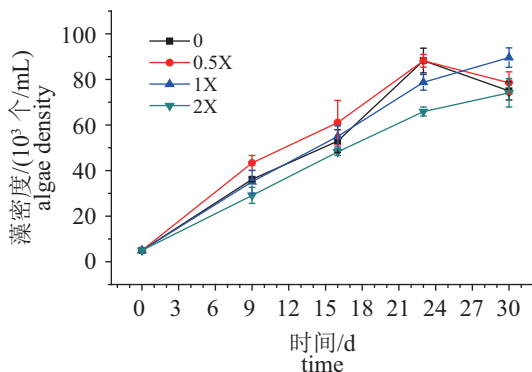


图4 维生素浓度对微小亚历山大藻生长的影响

Fig. 4 Effects of vitamin concentration on growth of *A. minutum*

在第30天达到最大值 $(89.61\pm 4.27)\times 10^3$ 和 $(74.13\pm 6.25)\times 10^3$ 个/mL。添加量在2倍时比在1倍时对应的藻密度小, 表明过量的维生素添加对藻的生长反而产生抑制作用。因此, 适宜的维生素添加量(1倍)既可有利的微藻的生长, 又能延缓微小亚历山大藻的衰亡。

在培养至第30天后, 检测各组的毒素含量。结果表明, 是否添加维生素及维生素的浓度对微藻的产毒含量和组成的影响均不显著($P>0.05$)(表8)。

2.5 碳浓度对微小亚历山大藻C4生长和产毒的影响

在培养至14、20、26 d时, 碳添加量为7064 $\mu\text{mol/L}$ 的藻密度显著大于同期其他组($P<0.05$), 但是在30 d时, 其藻密度与碳添加量为3532和5298 $\mu\text{mol/L}$ 时的藻密度的大小差异不显著($P>0.05$)(图5)。说明7064 $\mu\text{mol/L}$ 的碳浓度可以较好地促进藻的生长, 但是到后期这种生长优势会变得不明显。

碳浓度的含量对总毒素含量影响不显著($P>0.05$), 添加了碳酸氢钠后, 其GTX1/4占比值反而变小(表9)。

表 8 维生素浓度对微小亚历山大藻毒素含量和组成的影响

Tab. 8 Effects of vitamin concentration on toxin content and constitution of *A. minutum*

参数 parameters	维生素浓度/ $\mu\text{mol/L}$ vitamin concentration				F值 F value
	0	0.5	1	2	
$C_1/(\mu\text{mol/L})$	2.96±0.42 ^a	3.43±0.10 ^a	3.06±0.33 ^a	3.01±0.14 ^a	1.72
$C_2/(\mu\text{mol/L})$	0.15±0.03 ^a	0.16±0.02 ^a	0.15±0.01 ^a	0.13±0.01 ^a	0.87
$C_3/(\mu\text{mol/L})$	0.10±0.01 ^a	0.10±0.01 ^a	0.09±0.00 ^a	0.08±0.01 ^a	3.85
$C_4/(\mu\text{mol/L})$	1.17±0.10 ^a	1.31±0.04 ^a	1.18±0.13 ^a	1.17±0.08 ^a	1.50
$C_T/(\mu\text{mol/L})$	4.39±0.49 ^a	5.00±0.16 ^a	4.49±0.45 ^a	4.40±0.22 ^a	1.92
$\eta/\%$	94.35±1.20 ^a	94.83±0.54 ^a	94.59±0.50 ^a	95.13±0.00 ^a	0.79

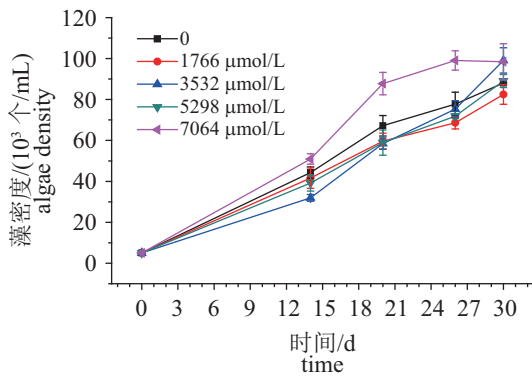


图 5 碳浓度对微小亚历山大藻生长的影响

Fig. 5 Effects of carbon concentration on growth of *A. minutum*

2.6 海水再利用对微小亚历山大藻C4生长和产毒的影响

由图6可知, 重复利用海水配制培养基较天然海水配制的培养基更适合微小亚历山大藻的生长, 培养至第30天时, 循环利用海水培养的藻密度达(105.61±6.28)×10³个/mL, 显著高于天然海

水培养的藻密度值(P<0.05)。

在培养至30 d后检测毒素, 经单因素方差分析表明, 是否循环利用海水进行微藻培养对其总毒素含量和GTX1/4占比值影响均不显著(P>0.05)(表10)。

3 讨论

目前, 虽然麻痹性贝类毒素的产毒机制还没有被完全阐明, 但在培养产毒藻的时候, 可以通过调整培养基中营养成分含量的方法来调节毒藻的生长密度和毒素产量。

微小亚历山大藻C4生长的最适氮浓度为441.5 μmol/L, 过高或过低的氮浓度都不利于其生长。江天久等^[5]在培养一株塔玛亚历山大藻的过程中也得出相似的规律, 但该藻生长的最适氮浓度为1765 μmol/L, 这可能是藻种及培养条件差异所致。虽然氮是蛋白质和核酸等生命物质的重要组成元素, 但是过量的硝酸盐对藻类的生长会产生抑制作用, 可能是过量氮在藻体内

表 9 碳浓度对微小亚历山大藻毒素含量和组成的影响

Tab. 9 Effects of carbon concentration on toxin content and constitution of *A. minutum*

参数 parameters	碳浓度/ $\mu\text{mol/L}$ carbon concentration					F值 F value
	0	1766	3532	5398	7064	
$C_1/(\mu\text{mol/L})$	3.24±0.31 ^a	3.20±0.14 ^a	3.46±0.12 ^a	3.44±0.26 ^a	3.48±0.11 ^a	1.32
$C_2/(\mu\text{mol/L})$	0.13±0.00 ^c	0.15±0.01 ^b	0.15±0.02 ^b	0.17±0.00 ^{ab}	0.18±0.01 ^a	14.15*
$C_3/(\mu\text{mol/L})$	0.05±0.00 ^b	0.07±0.01 ^a	0.06±0.01 ^{ab}	0.07±0.00 ^a	0.07±0.00 ^a	4.53*
$C_4/(\mu\text{mol/L})$	1.08±0.12 ^{ab}	1.06±0.00 ^b	1.19±0.06 ^a	1.19±0.03 ^a	1.17±0.01 ^{ab}	2.98
$C_T/(\mu\text{mol/L})$	4.50±0.43 ^a	4.47±0.12 ^a	4.85±0.20 ^a	4.86±0.29 ^a	4.90±0.11 ^a	2.04
$\eta/\%$	95.98±0.34 ^a	95.16±0.55 ^b	95.70±0.00 ^{ab}	95.16±0.38 ^b	94.94±0.28 ^b	4.02*

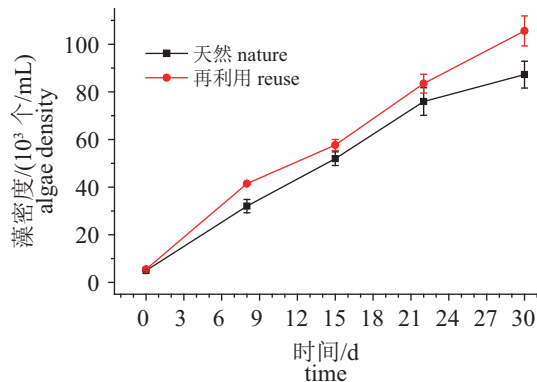


图6 海水再利用对微小亚历山大藻生长的影响

Fig. 6 Effects of sea water reuse on growth of *A. minutum*

表10 海水再利用对微小亚历山大藻毒素含量和组成的影响

Tab. 10 Effects of sea water reuse on toxin content and constitution of *A. minutum*

参数 parameters	海水类型 style of sea water		F值 F value
	自然海水 nature sea water	再利用海水 reuse sea water	
C_1 /($\mu\text{mol/L}$)	2.97±0.02 ^a	2.65±0.29 ^a	3.58
C_2 /($\mu\text{mol/L}$)	0.14±0.02 ^a	0.28±0.11 ^a	5.22
C_3 /($\mu\text{mol/L}$)	0.08±0.01 ^a	0.15±0.07 ^a	2.00
C_4 /($\mu\text{mol/L}$)	1.25±0.02 ^a	1.01±0.14 ^b	8.09*
C_7 /($\mu\text{mol/L}$)	4.45±0.09 ^a	4.09±0.48 ^a	1.63
η /%	94.95±0.68 ^a	89.53±4.01 ^a	5.32

积蓄转变成有害物质, 从而对藻的生长造成不利影响。

由表1中GTX1~4的分子结构可以算出GTX1和GTX4中氮元素占毒素分子量的23.8%, GTX2和GTX3中氮元素占毒素分子量的24.8%, 因此, 氮元素是GTX1~4的重要组成部分, 培养基中氮浓度的含量无疑会影响毒素的产量。Wang等^[10]观察到一株塔玛亚历山大藻氮浓度在0~880 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 毒素含量随着氮浓度的增加而增加。本实验结果符合上述产毒规律, 并且, 本实验在此基础上扩大了氮浓度的范围, 当氮浓度在883~3528 $\mu\text{mol/L}$ 范围内进一步增加时, 毒素含量增加并不明显。这可能是因为微小亚历山大藻已经在氮浓度883 $\mu\text{mol/L}$ 时达到产毒的氮饱和状态, 过多的氮无法有效地转化为毒素。

在毒素中有2对同分异构体GTX1/4和GTX2/3,

同分异构体之间在提取及贮存的过程中容易发生差向异构, 例如GTX1和GTX4在不同条件下发生相互的转化, 即11号碳原子上连接的2个原子团互换位置, 可以把GTX1和GTX4看成是同一种物质在不同条件下的2种形态。在分离制备毒素的过程中只需要将GTX1/4和GTX2/3两对同分异构体分开^[14], 在微小亚历山大藻C4的4种膝沟藻毒素中, GTX1/4为主要毒素, 占总毒素含量的比例远高于GTX2/3, 最高比例可达97.17%, 因此微小亚历山大藻C4可以作为GTX1/4的制备来源。而GTX1/4占比值越大, 对于后续的分纯化难度越小, 因此本实验考察GTX1/4占总毒素百分比, 为后续的毒素分离制备提供了理论依据。因此, 综合考虑毒素总量和GTX1/4占比, 微小亚历山大藻C4产毒的最佳氮添加浓度为883 $\mu\text{mol/L}$ 。

与氮一样, 磷也是生物体的重要组成元素, 并且磷还是生物膜、核酸等生命物质的必备元素。本实验中, 在培养至28 d时, 藻密度大小与磷的含量呈现出一定的正相关性。因此可以认为, 较高的磷浓度可以促进微小亚历山大藻的生长。

在产毒方面, 本实验数据显示, 当磷浓度在18.15 $\mu\text{mol/L}$ 时, 产毒总量最高, 磷添加量在36.3 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时, 产毒量反而下降。所以, 微小亚历山大藻在较低磷含量有利于产毒。与此类似, 一株塔玛亚历山大藻C101在磷浓度5~20 $\mu\text{mol/L}$ 范围内比磷浓度在30~40 $\mu\text{mol/L}$ 时的产毒量更高^[10]。磷虽然不是毒素的组成元素, 但是对毒素产量有显著的影响, 可能是因为磷限制条件下, 藻的增殖和生长受到限制, 导致藻生长对氮的需求减少, 从而体内多余的氮以毒素的形式储藏于体内。

本实验中, 7种微量元素(FeCl_3 、 Na_2EDTA 、 CuSO_4 、 Na_2MoO_4 、 ZnSO_4 、 CoCl_2 、 MnCl_2)的浓度为f/2基本浓度的0.5倍、1倍、2倍时都能够较好地生长。值得注意的是, 在微量元素为f/2培养基中微量元素的0和0.5倍时, 第31天的藻密度较之前有所减少, 可能是因为微量元素的消耗, 导致藻群较早出现衰亡迹象。因此, 亚历山大藻在适当的Fe、Mn、Cu浓度下生长得更好^[7, 11]。在产毒方面, 是否添加微量元素对产毒总量没有影响, 但添加微量元素与不添加微量元素的毒素组成比例有显著差异, 说明微量元

素在对GTX2/3转化成GTX1/4有一定促进作用。由于本研究考察的是复合微量元素整体对微小亚历山大藻产毒的影响,无法确定具体是哪些微量元素在其中作用显著,下一步将深入研究单一或某些组合元素对C4藻生长及产毒的影响。

空气中本身存在的CO₂在藻液与空气的界面上不断地进行动态平衡分配,微藻最终通过光合作用将藻液中的碳固定成生物体中的有机物。本实验的结果显示最高碳酸氢钠添加量(7064 μmol/L)的藻密度较其他浓度组生长要快,密度可高达99 000个/mL,提示未加碳的C4藻生长受到一定的碳限制。冯超^[12]向培养基中添加碳酸氢钠作为碳源,可以促进微小亚历山大藻的生长,缩短其生长周期。因此,碳酸氢钠的添加有利于提高生长速率。在冯超^[12]的实验中,碳酸氢钠的添加对毒素总量有促进作用,而在本实验中,虽然毒素量略有提升,但经过统计分析,这种提升作用并不显著,可能是因为通过添加碳酸氢钠这种调节方式的作用并不可以持续,即碳酸氢钠加入培养基后,随着碳的消耗、转化、溢出,导致这种碳的调节作用越来越弱。国内外在研究海水酸化的实验中有通过持续充入二氧化碳—空气混合气体的方式来提供不同的碳源含量^[15],下一步可以在这方面进行深入探究。

重复利用的海水配制的培养基比自然海水生长得更好。藻在生长的过程中为了维持体内的新陈代谢,要向周围的培养液中排泄或分泌产物,可能是某种或某类产物存在于培养液中,重复利用时作为营养源促进了藻的生长。

从实验可以看出,微小亚历山大藻的生长量和产毒量没有必然关系。例如在氮实验中,培养第30天后,氮浓度441.5 μmol/L时细胞数最大,但是产毒量却较氮浓度883~3532 μmol/L时少;又如在磷实验中,培养第28天后,磷浓度145.2 μmol/L时细胞数最大,但是产毒量却较磷浓度18.15~36.3 μmol/L时的产毒量少。说明每个藻细胞的平均毒素含量在不同环境下不一致。因此,不宜用藻密度的高低简单地判断含毒量的高低。

参考文献:

- [1] Wiese M, D'Agostino P M, Mihali T K, *et al.* Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs[J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(7): 2185-2211.
- [2] 缪宇平. 海藻生物活性物质研究——1. 天然海藻抗氧化剂—吡啶噻唑生物碱Martefragin A衍生物的合成及其生物活性研究; 2. 麻痹性贝毒之膝沟藻毒素Gonyautoxins的制备及其测定方法研究[D]. 上海: 复旦大学, 2003.
- [3] Miao Y P. Studies on natural substances from marine algae: 1. studies on synthesis & biological activities of natural antioxidant-martefragin a derivatives from alga; 2. studies on preparation & detection of paralytic shellfish toxins-Gonyautoxins[D]. Shanghai: Fudan University, 2003 (in Chinese).
- [4] Faust M A, Gullledge R A. Harmful marine dinoflagellates: *Alexandrium minutum*[DB/OL]. [2016-03-02]. http://species-identification.org/species.php?species_group=dinoflagellates&menuentry=soorten&id37&tabbeschrijving.
- [5] 蒋幼民, 张连生, 赵文彬. 麻痹性贝类毒素中毒的流行病学特征[J]. *现代预防医学*, 2004, 31(5): 711-712.
- [6] Jiang Y M, Zhang L S, Zhao W B. Epidemiological characteristics of paralytic shellfish poisoning[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2004, 31(5): 711-712(in Chinese).
- [7] 江天久, 徐轶肖. 塔玛亚历山大藻的生长研究[J]. *水生生物学报*, 2006, 30(4): 472-476.
- [8] Jiang T J, Xu Y X. Study on the growth of *Alexandrium tamarense* Balech[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(4): 472-476(in Chinese).
- [9] 李昌伟, 冯超, 江天久. N、P、Fe、Mn对微小亚历山大藻生长及产毒的影响[J]. *海洋环境科学*, 2014, 33(3): 341-345.
- [10] Li C W, Feng C, Jiang T J. Effects of N, P, Fe and Mn on the growth and toxicity of *Alexandrium minutum*[J]. *Marine Environmental Science*, 2014, 33(3): 341-345(in Chinese).
- [11] 黄邦钦, 徐鹏, 胡海忠, 等. 单种及混合培养条件下Fe、Mn对赤潮生物塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)生长的影响[J]. *环境科学学报*, 2000, 20(5): 537-541.
- [12] Huang B Q, Xu P, Hu H Z, *et al.* Effects of Fe and Mn on growth and cell size of *Alexandrium tamarense* under different culture conditions[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2000, 20(5): 537-541(in Chinese).
- [13] 张清春, 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.
- Zhang Q C, Yu R C, Zhou M J, *et al.* Effects of different phosphorus substrates on growth and toxin generation of *Alexandrium minutum*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 36(5): 465-474(in Chinese).
- [9] 卞中园, 杨锡洪, 解万翠, 等. 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[J]. 水产学报, 2013, 37(1): 78-85.
- Bian Z Y, Yang X H, Xie W C, *et al.* Effects of different inoculation densities on growth and toxin production of *Alexandrium minutum*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(1): 78-85 (in Chinese).
- [10] Wang D Z, Hsieh D P H. Effects of nitrate and phosphate on growth and C2 toxin productivity of *Alexandrium tamarense* CI01 in culture[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(1-12): 286-289.
- [11] 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.
- [12] 冯超. 不同培养条件对微小亚历山大藻生长及产毒的影响[D]. 广州: 华南师范大学, 2011.
- Feng C. Effects of different culture factors on the growth and toxin production of *Alexandrium minutum*[D]. Guangzhou: South China Normal University, 2011 (in Chinese).
- [13] Guillard R R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962, 8(2): 229-239.
- [14] Laycock M V, Thibault P, Ayer S W, *et al.* Isolation and purification procedures for the preparation of paralytic shellfish poisoning toxin standards[J]. *Natural Toxins*, 1994, 2(4): 175-183.
- [15] Tatters A O, Flewelling L J, Fu F X, *et al.* High CO₂ promotes the production of paralytic shellfish poisoning toxins by *Alexandrium catenella* from Southern California waters[J]. *Harmful Algae*, 2013, 30: 37-43.

Influences of nutrient environment on growth and toxin productivity of *Alexandrium minutum* C4

WANG Yajun¹, YU Xinwei², FANG Li², LIU Qilin¹,
REN Bin¹, LUO Hongyu^{1*}

(1. Key Laboratory of the Key Techniques on Health Hazard Factors of Seafood in Zhejiang Province,

Institute of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Zhoushan Center for Disease Control and Prevention, Zhoushan 316021, China)

Abstract: In order to grasp the influences of nutrients and sea water reuse on growth and toxin productivity of the *Alexandrium minutum*, single factor experiments were used to observe the influences of the concentration of nitrogen (NaNO_3), phosphorus (NaH_2PO_4), trace element (FeCl_3 , Na_2EDTA , CuSO_4 , Na_2MoO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , MnCl_2), vitamin (Vitamin B_{12} , Vitamin H, Vitamin B_1), carbon (NaHCO_3) and the style of sea water (new or reuse) on the growth, toxin content ($\mu\text{mol/L}$) and toxin constitution of *Alexandrium minutum* C4. The results showed that nitrogen and phosphorus had a significant effect on the total toxin content ($\mu\text{mol/L}$), while others had non-significant effect ($\mu\text{mol/L}$); nitrogen, phosphorus, trace element and carbon had a significant effect on the ratio of $\text{GTX1}/4(\text{GTX1}+\text{GTX4})$ to total toxin content($\text{GTX1}+\text{GTX2}+\text{GTX3}+\text{GTX4}$), while vitamin and sea water reuse had non-significant effect on that ratio. There was a positive correlation between the concentration of toxin and nitrogen when the nitrogen concentration was between 0 and 883 $\mu\text{mol/L}$, and then toxin content stayed invariant with the increase of nitrogen. However, with the increase of phosphorus concentration from 0 to 145.2 $\mu\text{mol/L}$, the toxin content increased at first, then reduced, and stayed invariant in the end. The optimal conditions for the toxin production were nitrogen 883 $\mu\text{mol/L}$, phosphorus 18.15 $\mu\text{mol/L}$, trace element one half of that in the f/2 medium and carbon free.

Key words: *Alexandrium minutum* C4; gonyautoxin; nutrient; paralytic shellfish toxin

Corresponding author: LUO Hongyu. E-mail: lisa8919@163.com

Funding projects: Common Marine Projects of Zhoushan Technology Bureau (2013 C31070); Project of National Spark Plan (2015GA700094); Innovation Plan of Science and Technology and Project of Planting Talent for College Students of Zhejiang Province (2015 R411059)