温度和氮、磷限制对南海一株利玛原甲藻 生长和产毒的影响

仲 云^{1,2}, 吴海燕², 江 涛², 郑关超², 吕颂辉³, 谭志军^{2,4}

(1.上海海洋大学海洋生态与环境学院,上海 201306; 2.中国水产科学研究院黄海水产研究所,山东 青岛 266071; 3.暨南大学赤潮与海洋生物学研究中心,广东广州 510632; 4.青岛海洋科学与技术试点国家 实验室,山东 青岛 266237)

摘 要:为评估我国南海海域分布的一株产毒底栖型利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*, HN45 株)的潜 在风险,在不同温度(20 °C、25 °C、30 °C)和氮、磷限制(氮磷比: 4.08、8.17、16.3、24.5、73.5、147)条件 下对其进行室内培养,比较了温度和氮、磷限制对该株赤潮藻的细胞数、比生长率和色素等生理特征及 其腹泻性贝类毒素(diarrhetic shellfish toxins, DSTs)生产特性的影响。多因素方差分析结果表明,温 度和磷限制均显著影响利玛原甲藻的细胞数、多甲藻素和大田软海绵酸(okadaic acid, OA)细胞内总 毒素含量。单细胞产毒量在温度为25 °C、磷浓度为6 μ M 时呈现最高值,即11.34 pg/cell。磷限制抑制 了藻细胞的生长和繁殖,但显著提高了其产毒能力。研究结果显示,该株藻细胞产毒以游离态 DSTs 素为主,其相应酯化态毒素含量仅占单细胞产毒总量的3%~14%,含量远低于游离态毒素。研究还发 现,利玛原甲藻所产叶绿素 a(chlorophyll a, Chl a)含量随生长周期的变化与 DSTs含量呈负相关,进 一步证实了 Chl a与 DSTs存在竞争关系,这对于解析环境胁迫条件下利玛原甲藻生存策略提供了重要 科学依据。

关键词:利玛原甲藻;温度;磷限制;腹泻性贝类毒素;生理特征 中图分类号:Q948.1 文献标识码:A 文章编号:1007-6336(2021)01-0057-09

Effects of temperature, nitrogen and phosphorous limitation on the physiological and toxigenic characteristics of harmful benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from South China Sea

ZHONG Yun^{1,2}, WU Hai-yan², JIANG Tao², ZHENG Guan-chao², LV Song-hui³, TAN Zhi-jun^{2,4}

(1.Shanghai Ocean University, College of Marine Ecology and Environment, Shanghai 201306, China; 2.Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3.Research Center for Harmful Algae and Marine Biology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 4.Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China)

Abstract: This study evaluated the potential risk for a harmful benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (strain HN45), which was isolated from the South China Sea. In this experiment, *P. lima* was cultured in laboratory under different temperatures (20 °C, 25 °C, 30 °C) and nitrogen phosphorous limitation conditions (nitrogen-to-phosphorus ratio, N/P: 4.08, 8.17, 16.3, 24.5, 73.5, 147). Then the physiological characteristics, including

基金项目:国家重点研发计划资助项目(2017YFC1600701);国家自然科学基金面上项目(31772075)

收稿日期:2019-08-28,修订日期:2019-11-07

作者简介:仲云(1994-),女,山东烟台人,硕士研究生,主要研究方向为海洋生物毒素风险评价, E-mail: zyn10421@126.com 通讯作者:谭志军, E-mail: tanzj@ysfri.ac.cn

cell density, growth rate and pigments, as well as the production characteristics of diarrhetic shellfish toxins (DSTs) were investigated and analyzed. Based on the multi-factor analysis of variance, the results showed that the temperature and phosphorus-limited levels had significant effect on cell density, peridinins (the typical pigments of dinoflagellates) and intracellular toxin of *P. lima*. The DSTs production ability of single cells reached to the highest value (11.34 pg/cell) at the temperature of 25 °C and phosphorus concentration of 6 μ M. Phosphorus deficiency reduced cells density and specific growth rate of *P. lima*, but significantly increased their ability to produce DSTs. Moreover, esterified toxins accounted for 3% to 14% of intracellular total toxins in *P. lima*, which was much lower than the free content toxins. In addition, chlorophyll *a* concentration of *P. lima* was negatively correlated with DSTs content. Which further confirmed the competition of the production of chlorophyll *a* and DSTs. Further research was needed to study the survival selective strategies of *Prorocentrum lima* under the ambient pressures.

Key words: *Prorocentrum lima*; temperature; phosphorous limitation; diarrhetic shellfish toxins; physiological characteristics

利玛原甲藻(Prorocentrum lima)是一种广泛 分布于热带、亚热带和温带水域的海洋底栖有 毒赤潮藻^[1-2],主要产生大田软海绵酸(okadaic acid, OA)和鳍藻毒素(dinophysistoxins, DTXs)等腹泻 性贝类毒素(diarrhetic shellfish toxins, DSTs), 可 对近海生态和食品安全造成严重影响^[3-5],因而 受到国际社会的重点关注^[6-7]。研究表明,利玛 原甲藻在自然条件下的生长和产毒极易受到外 界环境变化的影响。温度、营养盐、盐度和光照 等因素在不同程度上影响藻细胞的生理活性和 产毒能力[8-9],其中,温度和营养盐的改变对单细 胞产毒能力的影响最为显著。温度可影响利玛 原甲藻细胞代谢和碱性磷酸酶的活性,使其生长 速率、最大藻密度和胞内毒素含量产生变化。 研究指出,利玛原甲藻具有较强的环境温度适应 性,可以在5℃~30℃内生长。Wang等^[10]研 究发现,利玛原甲藻单细胞中 OA 和 DTX-1 的 含量在 30 ℃ 时呈现最高值, 但是此温度不利于 藻细胞的生长,说明温度对藻细胞生长和产毒机 制的影响存在差异性。另外,海洋环境中营养盐 的变化可影响藻类群落结构和生物量以及浮游 植物的生物化学组成^[11]。氮、磷限制虽会抑制 细胞基础代谢、改变色素组成和降低光合效率, 但更有利于藻细胞中 DSTs的合成和积累,其中 磷限制下单细胞产毒能力强于氮限制,说明磷元 素对藻细胞产毒的影响更显著^[12]。此外,利玛原 甲藻通过合成胞内毒素等次级代谢产物应对外 界环境压力,从而形成一种竞争补偿策略^[13]。因 此,研究温度和氮、磷限制对利玛原甲藻生长和 产毒的影响至关重要,这有助于理解环境压力下

藻细胞的生态功能和适应机制。

本研究选择分离自我国南海海域的一株利 玛原甲藻 HN45 株为研究对象,设置 3 组温度 (20 ℃、25 ℃、30 ℃)和6 组氮、磷限制条件(N/P= 4.08、8.17、16.3、24.5、73.5、147),通过分析 28 d 生长周期中藻细胞的细胞数、比生长率、色素及 其毒素(游离态毒素和酯化态毒素)组成和含量 变化,确定该株有毒藻最适生长和产毒的温度; 在此基础上探究氮、磷限制对其生长和产毒的 影响,进而探索藻细胞体内游离态毒素和酯化态 毒素的毒性及 DSTs 各组分的相互转化规律。

1 材料与方法

1.1 藻种

利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*, HN45株) 于 2015 年分离自我国南海海域(19°37′57′′N, 110°58′32′′E),由暨南大学赤潮与海洋生物学研 究中心提供,实验室内 f/2-Si 培养基^[14]进行培 养,温度为 25 ℃,光照强度为 125 µmol /(m²·s), 盐度 28~32,光暗周期为 12 h: 12 h。

1.2 实验试剂

(1)色素标准品: 叶绿素 a (Chl a)、脱镁叶绿素 a (Phe a)、二乙烯基叶绿素 a (DV chl a)、叶绿素 b (Chl b)、叶绿素 c 2 (Chl c 2)、叶绿素 c 3 (Chl c 3)、
Mg DVP、多甲藻素 (Peri)、脱镁叶绿酸 a (Pheidea)、19'-己酰基氧化岩藻黄素 (Hex-Fuco)、19'-丁酰基氧化岩藻黄素 (But-Fuco)、岩藻黄素 (Fuco)、新叶黄素 (Neo)、青绿黄素 (Pras)、紫黄素 (Viola)、
硅甲藻黄素 (Diadino)、硅藻黄素 (Diato)、别藻黄素 (Allo)、玉米黄素 (Zea)、叶黄素 (Lut)、角黄素

第1期

(Cantha)、β-胡萝卜素 (β, β-Car), 均购自丹麦 DHI 公司。

DSP 标准品: OA[C₄₄H₆₈O₁₃, (8.4±0.4) µg/mL, m/z=805.4733];DTX-2[C₄₄H₆₈O₁₃, (3.8±0.2)µg/mL, m/z=805.4733];DTX-1[C₄₅H₇₀O₁₃, (8.5±0.7)µg/mL, m/z=819.4889], 均购自加拿大国家研究理事会海 洋生物科学研究所(CRM)。

(2)化学试剂:甲醇、乙腈和丙酮(HPLC级, 美国 Merck 公司);甲酸铵(HPLC级,美国 Sigma Aldrich 公司);盐酸、氢氧化钠(优级纯,国药); 吡啶(色谱纯, Duksan Pure Chemicals);冰醋酸 (分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);植 物可溶性糖检测试剂盒和总蛋白定量测定试剂 盒(南京建成生物工程研究所)。其他未作特殊 说明的试剂均为分析纯,实验用水为超纯水 (18.2 MΩ. cm)。

1.3 实验设置

共设置温度和氮、磷限制实验组,每个条件 均设置3组平行。其中温度实验设置为20℃、 25℃和30℃3个变化温度,其他条件同1.1节; 氮、磷限制实验在f/2-Si培养基的基础上固定 NO₃⁻浓度,进行磷浓度调节,温度恒定为25℃, 共设置6组实验(表1),其他条件同1.1节。

表 1 氮、磷限制条件各组的氮、磷浓度以及相关的氮、磷比 (*n*=3)

Tab.1 Nitrate and phosphate concentrations (μ M) in the different growth media of nitrogen and phosphorous limited conditions and related N:P ratios (*n*=3)

组分	6P	3P	1.5P	Р	1/3P	1/6P
NO ₃	882	882	882	882	882	882
PO_4^{3-}	216	108	54	36	12	6
N/P	4.08	8.17	16.3	24.5	73.5	147

分别在藻细胞缓慢生长期、指数生长期和平 台期收集藻液,用于色素和毒素测定。取 20 mL 藻液经 47 mm Whatman GF/F(0.7 μm)玻璃纤维 膜过滤,将滤膜剪碎后放入盛有 3 mL 95% 甲醇 的聚乙烯离心管中,冰浴超声 5 min,上清液过 0.22 μm滤膜用于色素测定。取 30 mL藻液 8000 r/min 离心 5 min,用于毒素的测定。

1.4 实验各指标测定

1.4.1 生长分析

初始接种密度为 500 cells/mL, 接种后, 每隔

3 d(固定时间)取样,充分摇匀后取 5 mL 藻液于 离心管中,加 100 μL 鲁格试剂(Lugol's solution) 固定^[15],在 TE100 倒置显微镜(Nikon E100)下用 浮游植物计数框计数,记录细胞密度。

(1)比生长率测定,一般通过比生长率的变化来反映藻类的生长变化,以下式表示比生长率(μ)。

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \tag{1}$$

式中: μ 为比生长率,/d; N_2 为培养时间 t_2 的 藻细胞密度, cells/mL; N_1 为培养时间 t_1 的藻细 胞密度, cells/mL; t_2 为对应的培养时间,d; t_1 为对 应的培养时间,d。

(2)生长曲线拟合,以Logistic 方程的对数形 式拟合藻类的增长过程,计算方程可用式(2) 表达^[16]。

$$\ln\left(\frac{K-N}{N}\right) = a - rt \tag{2}$$

式中: K 为最大藻细胞密度, cells/mL; N 为 培养时间 t 的藻细胞密度, cells/mL; a 为曲线截 距; t 为培养时间; r 为内禀增长率, /d。首先进行 参数估计, 将最大藻细胞密度 (X_{max}) 作为 K 的估 计值, 以最小二乘法进行回归分析, 获得该方程 的截距和斜率作为 a 和 r 的估计值。

1.4.2 色素分析

采用液相色谱-紫外法分析藻细胞中的 22种色素组成,包括 Chl a、多甲藻素、岩藻黄素 和硅甲藻黄素等辅助色素,方法参照 Zapata 等^[17]。 色谱柱为 Waters Symmetry C8 柱(150×4.6 mm, 3.5 µm, 10 nm 孔径),柱温为 25 ℃,流速为 1 mL/min, 进样量为 100 µL。流动相中 A 相为甲醇:乙腈: 吡啶/醋酸溶液(体积比为 50:25:25),其中吡 啶/醋酸溶液的配制方法为 900 mL 超纯水中加 入 20 mL 吡啶和 10 mL 冰醋酸,调 pH 至 5.0,超 纯水定容至 1 L 后 0.45 µm 混合膜过滤。B 相为 甲醇:乙腈:丙酮(体积比为 20:60:20),流动相 梯度洗脱程序为 0~22 min, 40% B; 28~38 min, 95% B; 40~45 min, 0% B。

1.4.3 毒素分析

胞内游离毒素提取,方法参照 Quilliam^[18], 收集藻细胞加入 2 mL 80% 甲醇,低温超声破碎 10 min,离心取上清液并氮吹至干,用 5 mL 甲醇 复溶,过 0.22 μm 滤膜待测游离 DSTs。胞内总 毒素提取:取上述提取液于进样小瓶中,加入 125 μL 2.5 mol/L 氢氧化钠,涡旋后于 76 ℃ 加热 40 min,取出后迅速流水冷却至室温,加入 125 μL 2.5 mol/L 盐酸中和并混匀,过 0.22 μm 滤膜后待 测胞内总毒素。

DSTs 毒素分析色谱条件: 色谱柱为 Kinetex-C8 柱(150 mm× 2.1 mm, 2.6 µm); 柱温为 40 ℃; 流 速为 0.35 mL/min; 进样量取 10 µL; 流动相分为 A 相和 B 相, A 相为水(2 mmol/L 甲酸铵和 50 mmol/L 甲酸), B 相为 95% 乙腈水溶液(2 mmol/L 甲酸铵和 50 mmol/L 甲酸)。流动相梯度洗脱程 序: 0~0.50 min 为 80% A 相; 5.00~13.00 min 为 10% A 相; 13.1~15 min 为 80% A 相。

DSTs 毒素分析质谱条件: 扫描模式为 Full MS/dd-MS² 正离子模式, Full MS 采集范围取 *m/z* 600~1500, 分步碰撞能量为 10 eV 和 30 eV。DSTs 毒素标准曲线的浓度范围为 5~500 ng/mL。毒素成分浓度根据公式(3)计算:

$$X = \frac{C_1 V_1}{C_2 V_2} \times 1000 \tag{3}$$

式中: X为最终样品藻细胞的毒素浓度, pg/cells; C_1 为测定样品藻细胞的毒素浓度, ng/mL; V_1 为样品提取剂体积, mL; C_2 为样品藻 细胞密度, cells/mL; V_2 为样品藻液体积, mL。

1.5 数据处理

实验数据采用 origin Pro 8.5.1 和 SPSS 19.0 软件进行数据处理。采用多因素方差分析方法 和 F 检验分析比较各环境因子不同条件对利玛 原甲藻生长和产毒影响的显著性,按概率 (p<0.05) 设置显著性检验阈值。

2 结果与讨论

2.1 温度和氮、磷限制对利玛原甲藻生理特征 的影响

不同温度和氮、磷限制条件下藻细胞的生长 表2 不同温度下利玛原用藻 趋势如图 1 所示,其在 20 ℃、25 ℃ 和 30 ℃ 的 生长参数及拟合方程如表 2 所示。应用多因素 方差方法分析 3 种温度下的藻密度,发现不同温 度下藻细胞的生长情况存在显著差异(p<0.05)。 如图 1A 所示,30 ℃ 的藻密度始终高于其他两个 温度,并且 20 d 时藻密度(2.2×10^4 cells/mL)达到 最大,分别是 25 ℃ 和 20 ℃ 的 1.32 倍和 1.93 倍。 结合表 2 可知,30 ℃ 时藻细胞的 r 值最高,为 0.3283 /d,反映出藻细胞在 30 ℃ 时的增殖能力 最强。如图 1B,氮限制组的最高藻密度($2.05 \times$ 10^4 cells/mL)高于磷限制组,而且 r 值在各处理组 中差异显著(p<0.05),添加 216 μ M 磷元素的实验 组(6P)的 r 值最高,为 0.2634 /d,是最低值的 1.23 倍,然而磷限制组组内 r 值无明显差异(p>0.05)。



图 1 不同温度和氮、磷限制下利玛原甲藻生长曲线



表 2 不同温度下利玛原甲藻 Logistic 对数形式模型的参数与方程

Гаb.2	Parameters and equations of P.	lima in different	temperature by	Logistic l	Logarithm Model
-------	--------------------------------	-------------------	----------------	------------	-----------------

Т	$K/cells \cdot mL^{-1}$	а	r/d^{-1}	回归方程	回归系数
20 °C	12667	3.348 ± 0.3174	0.2806 ± 0.0324	$\ln \left[\frac{12667 - N}{N} \right] = 3.348 - 0.2806 t$	0.9487
25 °C	16767	3.528 ± 0.4961	$0.3239 \pm \! 0.0506$	$\ln \left[\frac{16767 - N}{N} \right] = 3.528 - 0.3239 t$	0.9089
30 ℃	22133	3.664 ±0.3487	0.3283 ± 0.0356	$\ln \left[(22133 - N)/N \right] = 3.664 - 0.3283 t$	0.9546

利用液相色谱-紫外法分析得到,利玛原甲 藻含有 Chl a 和 3 种辅助色素(多甲藻素、硅甲 藻黄素和岩藻黄素)。如图 2A 所示,多甲藻素 和 Chl a 是藻细胞主要色素, 两者含量分别占总 色素的 56.10% 和 16.80%, 其次是岩藻黄素和硅 甲藻黄素。如图 2B 和图 2C 所示,多甲藻素随 生长周期逐渐增加,而 Chl a 随生长周期变化与 其相反, 两者含量分别在 25 ℃ 平台期和缓慢生 长期呈现最高值,分别为 24.08 pg/cell 和 7.36 pg/cell, 是最低含量(30 ℃)的 1.43 倍和 1.56 倍。 另外多甲藻素/Chl a 随生长周期递增,在 25 ℃ 实 验组的比值(5.10)显著低于 20 ℃(6.37)和 30 ℃ (10.83), 此温度下的 Chl a 含量最高, 说明利玛 原甲藻参与光合作用中酶的活性在 25 ℃ 最高, 更有利于 Chl a 的生物合成。比较氮、磷限制实 验组中多甲藻素和 Chl a 含量,发现单细胞多甲 藻素在磷限制组的含量高于氮限制组,并在 1/3P 处理组达到最高,为18.73 pg/cell(图 3)。而 单细胞 Chl a 含量则在氮限制组更高,这说明培 养液中氮、磷元素的缺乏不同程度上限制了色

素的合成,磷限制促进多甲藻素的合成而抑制

Chl a 的合成。

温度和氮、磷浓度是影响利玛原甲藻生长的 最基本环境因子。研究表明,利玛原甲藻最高藻 密度和最大瞬时比生长率均出现在 30 ℃,但其 Chl a 和多甲藻素含量却在 25 ℃ 呈现最高值, 说 明藻细胞在不同温度会产生不同的生理生态响 应,这与利玛原甲藻原分离海域(19°37′57′′N, 110°58′32′′E)的温度及地域差异导致的基因多 样性有关。氮、磷营养元素常被用来预测藻密 度的变化和季节演替,成为藻细胞暴发时间和孢 囊萌发速度的关键因素之一^[19],磷限制会显著抑 制胞内 ATP 的合成和 H^+ -ATP 酶的活性, 从而影 响藻细胞的增殖^[20]。在营养限制胁迫下,藻细胞 的生长均受到抑制,但具有一定差异,其中磷限 制组 $(PO_4^{3-} = 6 \mu M \pi 12 \mu M)$ 的藻密度显著低于 对照组,氮限制组的藻密度和对照组无显著差 异,这说明磷限制对藻细胞的生长抑制作用较 大。同样,在磷限制胁迫条件下中肋骨条藻的细 胞生长受到抑制,但东海原甲藻可以利用胞内存 储的磷元素进行生长和繁殖^[21],显示出不同藻种 对磷元素的耐受机制与补偿生长存在差异。色



图 2 不同温度下利玛原甲藻色素总分布图和多甲藻素、Chl a 及两者的比值周期变化

Fig. 2 The pigments distribution, peridinin, chl a and peridinin/Chl a of P. lima in different temperature



图 3 不同氮磷限制下利玛原甲藻多甲藻素和 Chl a 的含 量变化

Fig. 3 The peridinin and Chl *a* of *P. lima* in different nitrogen and phosphorus limitation

素通常用来表征藻类生物量变化,而辅助色素 与 Chl *a* 的比值也能反映藻细胞的生理状态,研 究表明藻细胞的辅助色素与 Chl *a* 的比值随藻细 胞进入平台期而呈上升趋势^[22],这与本实验的结 果相同。藻细胞在生长后期为免受强光抑制而 促进多甲藻素的合成,从而降低了藻细胞的光补 集复合体和 PSII 的活性,导致多甲藻素与 Chl *a* 的比值随生长周期逐渐增加。藻细胞的光合作 用在 25 ℃ 时较强, 有利于 Chl a 合成酶的表达 调控, 使 25 ℃ 时的比值显著低于 20 ℃ 和 30 ℃。 因此, 多甲藻素与 Chl a 比值越低, 表示藻细胞生 长状态越好。氮、磷元素参与藻细胞的光合作 用和细胞代谢过程, 所以培养基中氮、磷元素的 缺乏必然影响细胞色素的合成。与氮限制不同 的是, 磷元素的缺乏降低了藻细胞合成 Chl a 的 效率但增加了单细胞内多甲藻素的含量, 这可能 与藻细胞体内各生物组分的合成机制有关, 未来 可以结合藻细胞内各色素含量来推测调查海域 环境中营养盐的变化。

2.2 温度和氮、磷限制对利玛原甲藻产毒特性的影响

产毒影响方面,分离自南海的利玛原甲藻主 要产生 OA、DTX-1 和 35S DTX-1 三种 DSTs 成 分,其中 35S DTX-1 是 DTX-1 的同分异构体^[23], 其质荷比、特征离子碎片(183、237、301、319)和 脱水峰(801、783、765、747、729 和711)均与DTX-1 相同。如图 4A、图 4B 和图 4C,OA、DTX-1 和 35S DTX-1 胞内总毒素含量在平台期达到最高, 而且 OA 胞内总毒素含量受温度影响差异显著



图 4 不同温度下利玛原甲藻各成分胞内总毒素含量和游离态以及酯化态的比例

Fig. 4 The toxin production of *P. lima* in different temperature and the proportion of free, esterified toxin

(p<0.05), 并在 25 ℃ 达到最高, 占比超过 90%, 而 DTX-1 和 35S DTX-1 则不足 10%。

如图 4D 所示, 酯化态毒素占总毒素比例的 3%~14%, 最高比例出现在 25 ℃, 其含量虽远低 于游离态毒素, 但仍是藻细胞总 DSTs 的重要组 成部分。如图 5 所示, 单细胞毒素含量随氮、磷 比增加大体呈升高趋势。氮限制组的单细胞胞 内总毒素含量高于对照组(P),但是其组内3个处理组对藻细胞产毒能力影响不显著。磷限制 对藻细胞OA胞内总毒素含量影响显著(p<0.05), 并且在1/6P组的含量最高(9.68 pg/cell),是对照 组的1.48倍,这表明磷限制可以提高藻细胞单 细胞产毒能力。另外,胞内OA和35SDTX-1比 例随周期增长而增加,但DTX-1从13%降到5%。





研究表明,利玛原甲藻主要含有 OA、DTX-1 和 35S DTX-1 三种毒素成分,其中 OA 胞内总毒 素含量受温度和磷限制影响差异显著,其含量在 温度为 25 ℃ 和磷浓度为 6 µM 时最高,为 11.34 pg/cell,占比超过 90%。低磷浓度虽会抑制藻细 胞分裂并干扰其代谢规律,但是磷限制会促进藻 细胞体积增大,同时合成毒素的速率不变,所以 单细胞内毒素含量会增加,这与 Vanucei^[13]的研 究结果相同。研究表明,利玛原甲藻储存营养盐 的能力强于硅藻和其他甲藻,同时产生毒素防止 浮游生物的摄食,从而形成一种补偿性竞争策 略。OA 与 DTX-1 的比值可以反映不同藻株所 产毒素的差异性,本实验中 OA 与 DTX1 的比值 为 14.78,比 Nascimento^[24] 研究中的比值小 4 倍, 但高于 Aquino^[25] 研究中的比值(OA/DTX-1=1.7~ 3.4),显示出藻细胞主要毒素成分为 OA 毒素,同 时说明利玛原甲藻在不同地区的产毒含量及其 种株差异显著。研究还发现 DTX-1 与 35S DTX-1 占总毒素的比例随生长周期不同呈现不同趋势, 基于两者是同分异构体的原因,推测 DTX-1 在 毒素形成过程中可能会部分转化为 35S DTX-1。 另外,利玛原甲藻为防止 DSTs 抑制叶绿体内丝 氨酸/苏氨酸蛋白酶的活性,通过光介导作用将 体内 DTX-4 和 DTX-5 等水溶性毒素转移到周围 的液泡中,转化成二酯基后并进一步生成游离态 毒素^[11]。利玛原甲藻胞内总毒素含量大于胞内 游离毒素含量,说明藻细胞体内含有酯化态毒 素,体内酯化态毒素是其存储毒素的一种形式, 藻细胞会通过毒素的转化与释放来应对外界环 境压力的变化,所以对其毒性及存在形式的研究 有助于评价利玛原甲藻总体毒素的风险性。

2.3 利玛原甲藻毒素产生机制与叶绿素 *a* 的相 关性

综合分析温度和氮、磷限制对藻细胞毒素和 色素的相关性得到毒素与 Chl a 及岩藻黄素呈负 相关关系,与多甲藻素等其他指标呈正相关。藻 细胞在 25 ℃ 时胞内总毒素含量由 3.70 pg/cell (缓慢生长期)增加到 11.21 pg/cell(平台期), 而 Chl a 含量则由 7.36 pg/cell 降到 4.71 pg/cell。如 表 3 所示, 25 ℃ 时毒素与 Chl a 含量的 Pearson 相关系数为 0.953, 表现一定的负相关性。而多 甲藻素含量随生长周期增长而增加, 与毒素变化 一致, 相关系数为 0.981。磷限制实验组也表现 出同样的关联性。

表 3 利玛原甲藻毒素与色素的相关性分析

Tab.3	The correlation	analysis	of toxin a	and pigments	in P.	lima
-------	-----------------	----------	------------	--------------	-------	------

因子	25 °C			磷浓度=6 µM, N/P = 147		
	线性拟合方程	R^2	Pearson's	线性拟合方程	R^2	Pearson's
叶绿素a	y = -0.385x + 8.206	0.817	-0.953	y = -0.385x + 5.087	0.933	-0.983
多甲藻素	y=2.128x+3.676	0.924	0.981	y = 0.998x + 5.915	0.949	0.987
岩藻黄素	y = -0.189x + 4.687	0.528	-0.874	y = -0.062x + 1.816	0.996	-0.999
硅甲藻黄素	y = 0.269x + 1.892	0.715	0.926	y = 0.096x + 1.510	0.548	0.880

Chl a 是藻细胞体内反应的中心光合色素,多甲藻素等其他辅助色素只起到捕获、传递光 能和防止光损伤的作用。相关性分析表明,胞内 毒素总量与 Chl a、多甲藻素和岩藻黄素的相关 性最高,胞内毒素总含量和多甲藻素含量随生长 周期而增加, 而 Chl a 含量则与其相反。前人研 究证明,利玛原甲藻藻细胞中 DSTs 和叶绿素均 在叶绿体内产生,所以其单细胞产毒量与叶绿素 含量密切相关^[26]。Needham^[27]等人利用同位素 标记法研究 DTX-4 和 OA 二醇酯的生物合成中 发现 DSTs 结构中的碳原子来源于乙酸盐和乙 醇酸盐。藻细胞 DSTs 与 Chl a 的合成能量源于 叶绿体卡尔文循环中的葡萄糖,两者的前体物质 分别是甘氨酸和谷氨酸^[28]。本实验推测藻细胞 在生长前期更多利用外源有机质中谷氨酸合成 Chla,但随着其大量繁殖,水体中溶解氧降低,藻 细胞残体中的磷元素释放到水体中,同时经过一 系列反应使合成毒素的底物增加,最终单细胞毒 素含量升高。因此,利玛原甲藻毒素和 Chl a 的 合成可能存在相互竞争的关系。

3 结 论

温度和氮、磷限制影响利玛原甲藻(Prorocentrum lima, HN45 株)的生理特征及其 DSTs 生产 特性。温度和磷限制对利玛原甲藻的细胞数、 色素含量和毒素成分影响显著, 藻细胞最适生长 温度为 30 ℃, 单细胞最佳产毒温度为 25 ℃, 其 体内所产生的 DSTs 与 Chl *a* 的周期变化呈负相 关, 进一步证实了两者存在竞争关系。磷限制 (NO₃⁻= 882 μ M, PO₄³⁻ = 6 μ M)虽会抑制藻细胞 的生长, 但可提高其单细胞产毒能力。由此可 见, 利玛原甲藻在营养盐胁迫条件下可以通过产 生毒素形成一种补偿性竞争策略。另外, 通过研 究酯化态毒素的毒性和存在形式并探明其与游 离态毒素的转化关系, 有助于进一步评价南海海 域利玛原甲藻的潜在生态风险。

参考文献:

- FAUST M A. Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely differing sites[J]. Journal of Phycology, 1991, 27(5): 642-648.
- [2] NAGAHAMA Y, MURRAY S, TOMARU A, et al. Species boundaries in the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Dinophyceae, Prorocentrales), based on morphological and phylogenetic characters[J]. Journal of Phycology, 2011, 47(1): 178-189.
- [3] LEVASSEUR M, COUTURE J Y, WEISE A M, et al. Pelagic and epiphytic summer distributions of *Prorocentrum lima* and *P. mexicanum* at two mussel farms in the Gulf of St. Lawrence, Canada[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2003, 30: 283-293.
- [4] MARANDA L, CORWIN S, DOVER S, et al. Prorocentrum

lima (Dinophyceae) in northeastern USA coastal waters: II : toxin load in the epibiota and in shellfish[J]. Harmful Algae, 2007, 6(5): 632-641.

- [5] LI A F, MA J G, CAO J J, et al. Toxins in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) associated with diarrhetic shellfish poisoning episodes in China[J]. Toxicon, 2012, 60(3): 420-425.
- [6] EFSA. Marine biotoxins in shellfish- okadaic acid and analogues - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain[J]. EFSA Journal, 2008, 6(1): 589.
- [7] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Marine biotoxins[M]. Rome, Italy: FAO, 2004: 1-229.
- [8] MORTON S L, NORRIS J. Role of temperature, salinity, and light on the seasonality of *Prorocentrum lima* (ehrenberg) dodge[M]//GRANÉLI E, SUNDSTRÖM B, EDLER L, et al. Toxic Marine Phytoplankton. New York: Elsevier, 1990: 201-205.
- [9] 徐 杏, 于仁成, 罗 璇, 等. 温度、盐度和光照对一株有毒利 玛原甲藻生长的影响研究[J]. 海洋科学, 2012, 36(12): 19-24.
- [10] WANG S, CHEN J H, LI Z Y, et al. Cultivation of the benthic microalga *Prorocentrum lima* for the production of diarrhetic shellfish poisoning toxins in a vertical flat photobioreactor[J]. Bioresource Technology, 2015, 179: 243-248.
- [11] LEE T C H, FONG F LY, HO K C, et al. The mechanism of diarrhetic shellfish poisoning toxin production in *Prorocentrum* spp.: physiological and molecular perspectives[J]. Toxins, 2016, 8(10): 272.
- [12] VARKITZI I, PAGOU K, GRANéLI E, et al. Unbalanced N:P ratios and nutrient stress controlling growth and toxin production of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge[J]. Harmful Algae, 2010, 9(3): 304-311.
- [13] VANUCCI S, GUERRINI F, MILANDRI A, et al. Effects of different levels of N- and P-deficiency on cell yield, okadaic acid, DTX-1, protein and carbohydrate dynamics in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*[J]. Harmful Algae, 2010, 9(6): 590-599.
- [14] 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.
- [15] LAI J X, YU Z M, SONG X X, et al. Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2011, 405(1/2): 6-17.
- [16] LI X, HU H Y, ZHANG Y P. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3098-3102.
- [17] ZAPATA M, RODRIGUEZ F, GARRIDO J L. Separation of

chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C_8 column and pyridine-containing mobile phases[J]. Marine Ecology Progress Series, 2000, 195: 29-45.

- [18] QUILLIAM M A, HARDSTAFF W R, ISHIDA N, et al. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods[M]//YASUMOTO T, OSHIMA Y, FUKUYO Y. Harmful and Toxic Algal Blooms. Paris: IOC/UNESCO, 1996: 289–292.
- [19] ACCORONI S, GLIBERT P M, PICHIERRI S, et al. A conceptual model of annual *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in the northern Adriatic Sea based on the synergic effects of hydrodynamics, temperature, and the N:P ratio of water column nutrients[J]. Harmful Algae, 2015, 45: 14-25.
- [20] GLIBERT P M, BURKHOLDER J M, KANA T M. Recent insights about relationships between nutrient availability, forms, and stoichiometry, and the distribution, ecophysiology, and food web effects of pelagic and benthic *Prorocentrum* species[J]. Harmful Algae, 2012, 14: 231-259.
- [21] 夏荣霜, 徐兆礼, 高 倩. 东海原甲藻在氮、磷限制胁迫下的 补偿生长[J]. 中国水产科学, 2014, 21(6): 1200-1210.
- [22] NASCIMENTO S M, PURDIE D A, MORRIS S. Morphology, toxin composition and pigment content of *Prorocentrum lima* strains isolated from a coastal lagoon in southern UK[J]. Toxicon, 2005, 45(5): 633-649.
- [23] PAN L, CHEN J H, SHEN H H, et al. Profiling of extracellular toxins associated with diarrhetic shellfish poison in *Prorocentrum lima* culture medium by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. Toxins, 2017, 9(10): 308.
- [24] NASCIMENTO S M, SALGUEIRO F, MENEZES M, et al. Prorocentrum lima from the South Atlantic: morphological, molecular and toxicological characterization[J]. Harmful Algae, 2016, 57: 39-48.
- [25] AQUINO-CRUZ A, PURDIE D A, MORRIS S. Effect of increasing sea water temperature on the growth and toxin production of the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*[J]. Hydrobiologia, 2018, 813(1): 103-122.
- [26] ZHOU J, FRITZ L. Okadaic acid antibody localizes to chloroplasts in the DSP-toxin-producing dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum maculosum*[J]. Phycologia, 1994, 33(6): 455-461.
- [27] NEEDHAM J, HU T M, MCLACHLAN J L, et al. Biosynthetic studies of the DSP Toxin DTX-4 and an okadaic acid diol ester[J]. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1995, (16): 1623-1624.
- [28] 王平荣, 张帆涛, 高家旭, 等. 高等植物叶绿素生物合成的研 究进展[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3): 629-636.