

# 一种棕囊藻的形态特征与毒素分析\*

何家苑 施之新 张银华 刘永定

(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

江天久 尹伊伟 齐雨藻

(暨南大学水生生物研究所 广州 510632)

**摘要** 于1997年11月,在广东省汕头地区饶平县海面采集棕囊藻,采用显微观察和光谱分析方法,进行形态特征与毒素结构的研究。结果表明,该种藻具有两种不同的藻体形态:一种是不运动的球形群体(直径0.1—3cm),外具胶质被,群体内的细胞有近千至数万个,每个细胞(直径3—7.5 $\mu$ m)有2—3个黄褐色的叶绿体;另一种是游动的单细胞,具有两根几乎等长的鞭毛和一根短的定鞭丝(也称为附着鞭毛或触丝),常呈球形。将反复冻融或冷冻干燥的藻细胞经有机溶剂提取,用新鲜牛血球测定显示出具有强的溶血毒素特性。溶血毒素经硅胶柱层析纯化,被分成5个组分,对溶血活性高的组分进行化学结构测定的结果表明,该藻溶血毒素是一个以1'-O-十七碳二烯酰基-3'-O-(6-O- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基)-甘油为主的糖脂混合物。

**关键词** 赤潮 棕囊藻属 形态特征 溶血毒素

**学科分类号** Q946

随着污染的加剧,近年来中国沿海不断发现新的产毒赤潮藻类和毒素。1997年7—12月在中国东南沿海水面首次发生大规模的棕囊藻类有毒赤潮,给水产养殖造成了严重损失,同时对渔民生活构成了一定的威胁。棕囊藻属隶属于定鞭藻类(Prymnesiophytes或Haptophytes),对于该属藻类有关毒素方面的研究报道极少,Eilertsen等(1994)报道该藻能产生有溶血作用的毒素,Yang等(1992)指出在*Phaeocystis* sp.水华发生期间的水体中含有丙烯酸(Acrylic acid)和二甲硫醚(Dimethyl sulfide, DMS),但进一步的研究尚未见报道。本文报告对在赤潮现场收集到的一种棕囊藻的形态特征与毒素结构的研究结果,以期为中国赤潮棕囊藻类及其产生的毒素特征提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集和前处理

1997年11月,用10号和25号浮游生物网在广东省汕头地区饶平县拓林镇的大门港和小门港海面采集赤潮藻,并进行前处理:取部分藻细胞,分成新鲜和固定二份标本,带回

\* 国家自然科学基金赤潮重大项目,39790110号;国家自然科学基金资助项目,39770155号。何家苑,女,出生于1941年4月,副研究员,Fax: 0086-027-87875132

收稿日期:1998-05-07,收修改稿日期:1998-11-16

实验室进行形态特征观察及藻种分离；取较多的赤潮藻类，滤去海水，将浓稠的藻细胞洗去盐分，冷冻干燥（或 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存）后备用。采集时水温为 $20^{\circ}\text{C}$ 左右， $\text{pH} = 7.0$ 。

## 1.2 形态特征观察

用 Olympus BHS 型显微镜对样品进行观察，并对其形态特征进行鉴别和研究。

## 1.3 毒素的提取

取在 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的浓稠藻细胞约 2.0g，加入适量蒸馏水，反复研磨并冻融至少 3 次，离心、收集上清液并浓缩，进行毒素检测。取出上清液后，沉淀、用甲醇反复提取，将提取液蒸发干燥后加适量蒸馏水进行毒素检测。

## 1.4 毒素活性测定

牛血球悬浊液的制备及标准曲线制作参照何家菀等(1996)。在每个 5ml 试管中加入 3ml 牛血球悬液( $\text{OD}_{640} \approx 0.7$ )和 0.05—0.1ml 样品或对照(水或甲醇、乙醇等)，混合液在 $37^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中温育 20min，在 $\text{OD}_{640}$ 处测定光吸收值。对照标准曲线计算出溶血素单位。

## 1.5 毒素的结构分析

将获得的较纯毒素样品进行傅立叶变换-红外光谱(FT-IR)、快速原子轰击质谱(FAB-MS)和色谱-质谱联用(GC-MS)分析，测算毒素的分子结构。

# 2 结果

## 2.1 赤潮藻的形态特征

赤潮在海面上呈带状分布，黄色，手感粘滑，发出难闻的气味，肉眼可见到许多大小不等的球形胶质体。这种赤潮可长达 10 多公里，宽达几公里。经显微镜鉴别表明，赤潮中的藻类主要是以胶质群体的形态存在，同时还存在游动的单细胞形态。根据该赤潮藻的群体与游动的细胞的形态特征可确定它为定鞭藻类(Prymnesiophytes 或 Haptophytes)中的棕囊藻属(*Phaeocystis*)。

其形态特征描述如下：

**群体形态：**群体一般呈球形或近球形，外具一层柔软的胶质被。群体大小的差别很大，最小的群体仅 0.1cm 左右，最大的群体可达 2—3cm，内含近千至数万个细胞，基本上分布在群体的周层。群体中的细胞，呈球形或近球形，有时形状不规则，直径 3—7.5 $\mu\text{m}$ ；每个细胞具 2—3 个叶绿体，圆盘状和片状，周生，黄褐色。群体内的细胞以不断的分裂进行增殖(图 1: 1, 3, 4)。

**游动的单细胞形态：**细胞常呈球形或近球形，前端略凹入，直径 2.5—7.0 $\mu\text{m}$ ，前端具两条几乎等长的鞭毛，约为体长的 1.5—2 倍，一条向前呈波状运动，一条斜向后方；除两条鞭毛外还有一条短的定鞭丝(亦称附着鞭毛或触丝，约为体长的 1/4，直向。游动细胞一般在破裂的大群体水样中见的较多(图 1: 2)。

## 2.2 赤潮藻毒素的鉴定与纯化

取 2g 冷冻的鲜藻细胞，加适量水反复研磨并冻融 3 次后，10 000r/min 离心 20min，获得约 10ml 黄绿色上清液，蒸发浓缩至 2ml，按 1.4 中的方法测出溶血毒素活性约为 17 溶血毒素单位(HU)/ml；同时将离心沉淀的藻细胞用甲醇反复提取，获得 3ml 提取液，经测定溶血活性为 22HU/ml。结果均表明该藻含有溶血毒素。

在确定该藻含溶血毒素后，将冷冻干燥的藻细胞进一步作毒素的分离纯化。称取 5g

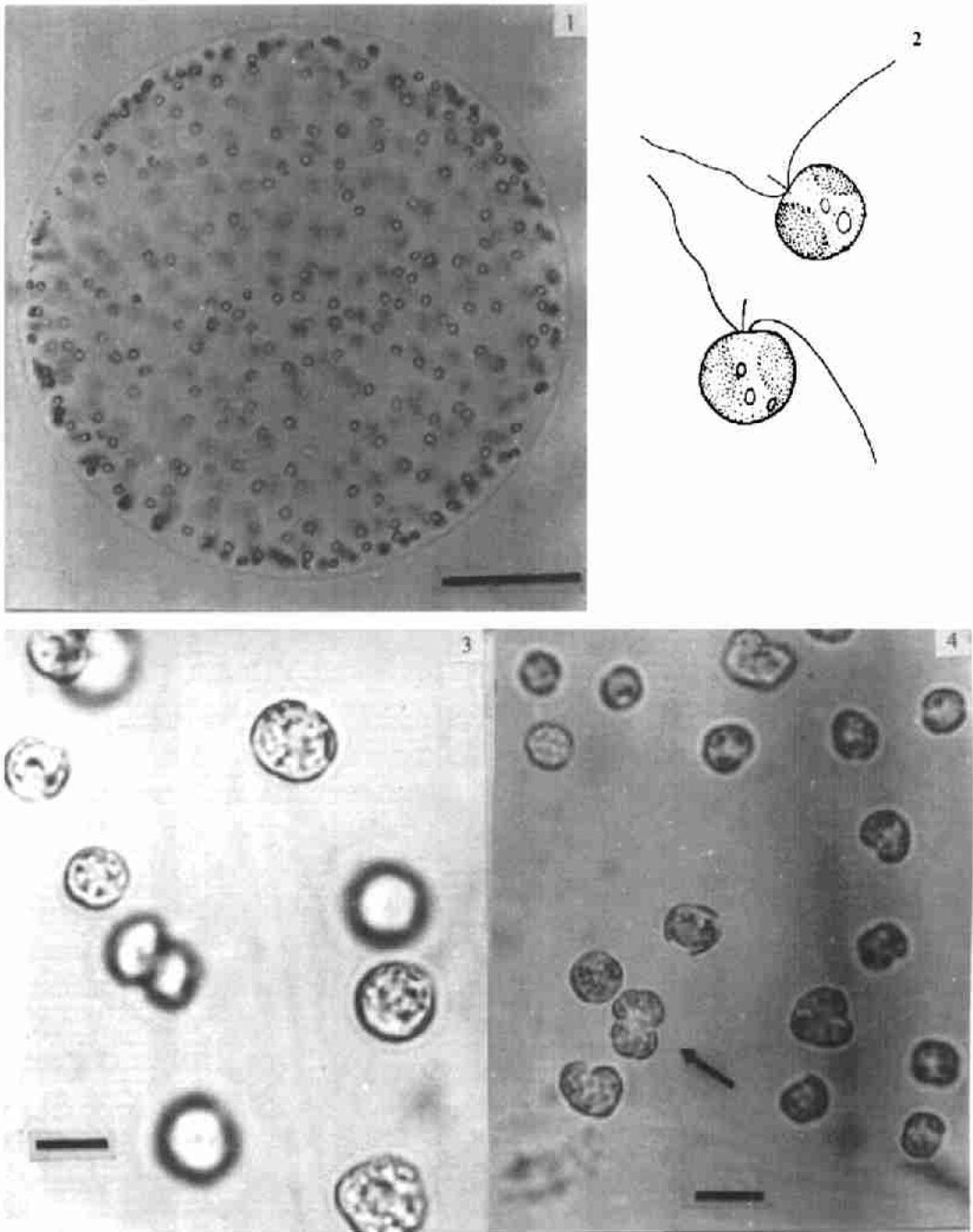


图1 棕囊藻的形态特征

Fig.1 The Morphological characteristics of *Phaeocystis* cf. *pouchetii*

1. 不游动的球形群体, 外具胶质被, 细胞分布在周层(比例尺=0.1mm); 2. 游动的单细胞, 具有2条几乎等长的鞭毛和1条短定鞭丝(比例尺=5 $\mu$ m); 3. 群体内的细胞, 呈球形或近球形(比例尺=5 $\mu$ m); 4. 群体内的细胞, 有些正在分裂(箭头所示)(比例尺=10 $\mu$ m)

冷冻干燥的藻细胞, 加 100ml 正丁醇(n-Butanol)连续搅拌过夜, 10 000r/min, 离心 20min.

正丁醇提取液被蒸发至干燥。将3次提取的正丁醇干燥物(约50mg),用氯仿-甲醇-水(7:13:8)混合液提取,在分液漏斗中充分混合后静置1h,慢慢取出混合液的下相,将下相旋转蒸发干燥,用少量氯仿-甲醇(7:3)混合液溶解后过硅胶柱(Silica gel),然后再用氯仿-甲醇(10:1)混合液洗脱,收集含不同色素的5个组分,经测定,将溶血毒素活性高的洗脱液浓缩干燥,得到较纯毒素固体物5mg,每毫克含1500溶血毒素单位。

### 2.3 毒素结构的测定

较纯的溶血毒素红外光谱分析表明,在 $3400\text{cm}^{-1}$ 系羟基的伸缩振动吸收峰, $1150\text{cm}^{-1}$ 及 $1080\text{cm}^{-1}$ 系C-O键的伸缩振动吸收峰,说明含有羟基; $1653\text{cm}^{-1}$ 系非共轭

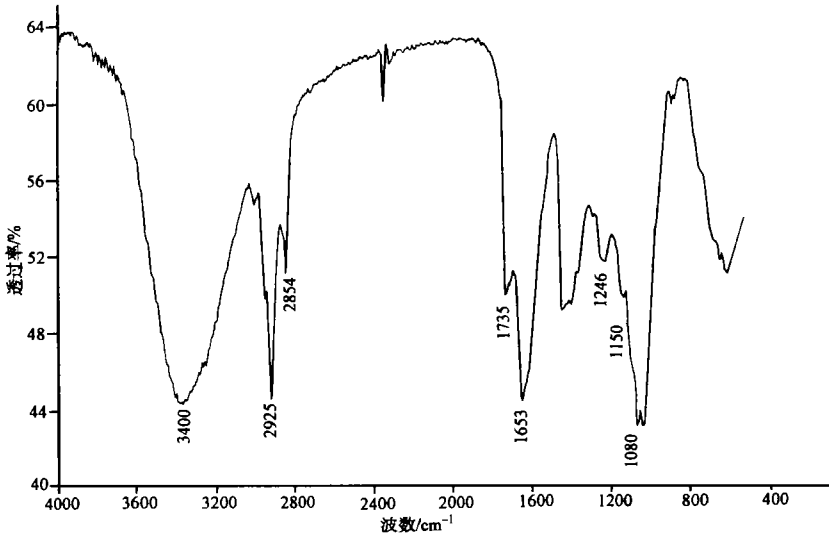


图2 棕囊藻溶血毒素的傅立叶变换-红外光谱图

Fig.2 The FT-IR spectra of hemolysin in *Pheocystis cf. pouchetii*

的C=C双键的伸缩振动吸收峰,说明含有非共轭的C=C双键; $1735\text{cm}^{-1}$ 、 $1246\text{cm}^{-1}$ 系C-O-C键的对称和逆对称伸缩振动吸收峰,说明含有酯键(图2)。

取较纯的溶血毒素约1mg,加10ml甲醇、0.4gNaOH,在 $80^\circ\text{C}$ 回流4h后加5ml去离子水,用6mol/L HCl调到 $\text{pH} = 2-3$ ,毒素中的脂肪酸被溶液中的甲醇进行酯交换而生成脂肪酸甲酯,用乙醚提取2-3次,合并提取液,浓缩干燥。干燥后的脂肪酸甲酯经色谱-质谱联用分析测定,结果如图3所示。

由图3可知,该毒素含有 $\text{C}_{14:0}$ 和 $\text{C}_{16:0}$ 饱和脂肪酸,而未检出不饱和脂肪酸,说明在制备脂肪酸甲酯的过程中,不饱和脂肪酸被破坏了。实验同时选择了比较温和的条件进行脂肪酸的甲酯化方法,但未检测出脂肪酸,说明该类溶血毒素

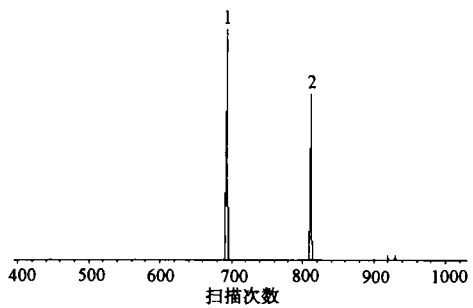


图3 棕囊藻溶血毒素中脂肪酸甲酯的GC-MS总离子流图

Fig.3 The GC-MS total ion current of fatty acid methyl ester derived from hemolysin in

*Pheocystis cf. pouchetii*

1.  $\text{C}_{14:0}$ ; 2.  $\text{C}_{16:0}$

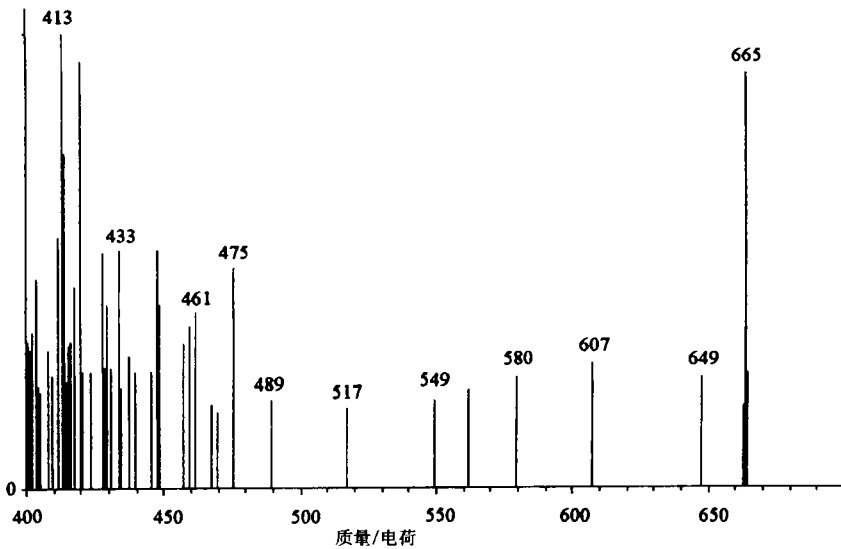


图4 棕囊藻溶血毒素的FAB质谱图

Fig.4 The FAB mass spectra of hemolysin in *Phaeocystis* cf. *pouchetii*

中的脂肪酸难以用一般的甲酯化条件进行衍生,剧烈的甲酯化条件常常导致不饱和脂肪酸分解。

由 FAB 质谱图(图 4)可知,该溶血毒素主要组分之一的准分子离子峰  $[M + H]^+ = 665$ , 则其分子量为 664, 推测该分子中含有两个吡喃半乳糖、一个甘油和一个  $C_{17:2}$  脂肪酸。该结果与前沟藻 (*Amphidinium cartria*) 产生的溶血毒素 II 相类似 (Yasumoto *et al*, 1987)。

虽然从 FAB 质谱分析结果来看,该溶血毒素中的  $C_{17:2}$  脂肪酸丰度很高,但在将溶血毒素皂化的同时也进行甲酯化后,只检测出  $C_{14:0}$  和  $C_{16:0}$  两种脂肪酸。这可能是  $C_{17:2}$  脂肪酸在这种甲酯化条件下极其不稳定所致。

高效液相色谱 (HPLC) 和色谱-质谱联用 (GC-MS) 分析表明, 该溶血毒素是一种糖酯类混合物, 其分子中脂肪酸可为  $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$  和  $C_{17:2}$  等脂肪酸。该溶血毒素的主要成分是 1'-O-十七碳二烯酰基-3'-O-(6-O- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基)-甘油。

### 3 讨论

#### 3.1 赤潮中棕囊藻属种类的分类问题

棕囊藻属隶属于定鞭藻类 (Prymnesiophytes 或 Haptophytes), 至今已报道的种类约有 9 种, 其中以鲍奇棕囊藻 (*P. pouchetii*) 最为常见, 报道也最多; 其次是球形棕囊藻 (*P. globosa*), 但是 Soarnia (1988) 对棕囊藻属中的种类进行分析后, 认为大多数的种类是可疑的, 而只有鲍奇棕囊藻较为可靠, 甚至球形棕囊藻也是它的一个同物异名。

此次在汕头地区沿海赤潮中采得的棕囊藻属标本 (以下简称为“汕头标本”), 将其形态特征与鲍奇棕囊藻有关的形态特征描述进行的比较, 发现由于不同学者的描述有所不同, 因此汕头标本的形态特征与不同学者的描述都存在有异同性 (Hibberd *et al*, 1985; Inouye, 1990)。汕头标本的基本特征与鲍奇棕囊藻较为相近, 但也存在明显的不同: (1) 汕头标本的群体超常地大, 最大直径可为文献描述的 30 倍左右; (2) 汕头标本中游动的细

胞未见到星状的驱器(Ejectile organelle)。另一方面,棕囊藻属的生活史比较复杂,它不仅具有群体和游动性的单细胞二个阶段,同时还有微孢子、大孢子等生殖过程(可能还存在有性生殖过程),而汕头标本只观察到胶质群体和游动性单细胞二种藻体形态,生活史的其他阶段和形态尚未见到。另外汕头标本游动细胞外的硅质鳞片由于种种原因也未进行观察。按照 Sournia(1988)的建议,在对棕囊藻属进行种类鉴定时,因其形态的复杂性和可变性,种名的确定应非常谨慎,在没有十分把握时,种名应暂写成 *Phaeocystis cf. pouchetii* (表示所鉴定的标本与鲍奇棕囊藻相似),甚至可写成未定种形式 *Phaeocystis sp.*。鉴于对汕头标本只进行了初步的形态观察,且对其生活史未进行研究,虽然其基本形态与鲍奇棕囊藻相似,但只能将其种名暂定为 *Phaeocystis cf. pouchetii*。

应当指出的是,虽然球形棕囊藻被归在鲍奇棕囊藻中,但鲍奇棕囊藻明显地存在有两种形态,即“鲍奇形态”(pouchetii-like)和“球形形态”(globosa-like)。同时,据文献记载(Jahnke, 1989),鲍奇棕囊藻为冷水性种类,而球形棕囊藻为暖水性种类。因此,采于水温达 20℃ 左右的汕头标本很可能是属于球形形态的“鲍奇棕囊藻”,即是原来的球形棕囊藻。它的群体超常地大,这是否是鲍奇棕囊藻由于环境引起的一种形态变化现象,有待进一步研究。

### 3.2 关于 *Phaeocystis cf. pouchetii* 的危害及其毒素结构

棕囊藻(*Phaeocystis cf. pouchetii*)球形群体外围具有一层柔软的胶质被,且藻体含糖(Myklestad, 1995),当它们大量繁殖形成赤潮时,含胶质和糖的藻体紧紧贴在鱼鳃上,严重影响鱼的呼吸及摄食,致使鱼窒息、缺食而死亡;其次,巨大的生物量(尤其是在黎明和傍晚)可造成水体缺氧,也是造成灾害的另一个原因;再加上藻细胞及藻体腐烂产生的毒素如溶血毒素、二甲硫醚等对水环境及人体健康造成大的危害,因此棕囊藻赤潮成为我国有害有毒的严重赤潮之一,研究它的发生及产毒机理,预防其危害是当务之急。

本文首先将采集的棕囊藻浓缩液进行小白鼠生物毒性测试实验,发现该藻不含赤潮甲藻所产生的麻痹毒素(PSP)、神经毒素(NSP)和腹泻毒素(DSP),而牛血球和小白鼠红血球实验表明该藻含溶血毒素(Hemolysin),同时发现牛血球对毒素比较敏感。形成赤潮并产生溶血毒素的藻主要有小定鞭藻(*Prymnesium parvum*)和聚球藻(*Synechococcus sp.*)等,尽管溶血毒素化学结构的研究结果尚不一致,但近期多数研究表明,它们属于糖酯类或糖甙类物质(Mitsui *et al*, 1988; Kaya *et al*, 1993)。根据红外光谱(FT-IR),快速原子轰击质谱(FAB-MS)和色谱-质谱联用(GC-MS)分析结果,本文推测棕囊藻溶血毒素结构见图 5。

以上研究结果表明,该藻所含溶血毒素的结构与作者曾报道过的小定鞭藻溶血毒素特性和结构相似,这可能是由于它们同属定鞭藻目,因此产生类似的毒素。有关这方面的研究,需在纯培养成功后才能深入进行。

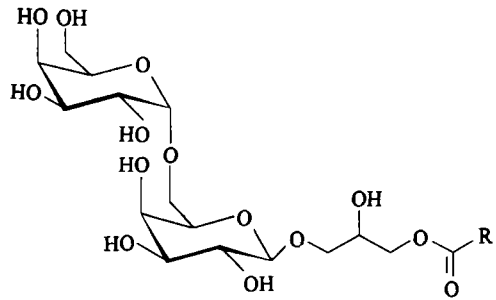


图5 棕囊藻溶血毒素的结构式

Fig.5 The structure of hemolysin in *Phaeocystis cf. pouchetii*

A:  $R=CH_3(CH_2)_{11}CH_2$ ; B:  $R=CH_3(CH_2)_{13}CH_2$ ;

C:  $R=CH_3(CH_2)_4CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_5CH_2$ .

## 参 考 文 献

- 何家菀, 陈明惠, 何振荣, 1996. 小定鞭藻毒素的分离与鉴定. 水生生物学报, 20(1): 41—48
- Eilertsen H C, Raa J, 1994. Phytoplankton Toxins in Sea-water. In: International Advisory Comm. of the Int. Mar. Biotechnology, Conference ed. 3rd International Marine Biotechnology Conference: Program, Abstracts and List of Participants. N-9002 Tromsø, Norway: Tromsø University, 69
- Hibberd D J, Leedale G F, 1985. Order 7. *Prymnesiida*. In: Lee J J, Hutner S H, Bovee E C *et al* ed. Illustrated Guide to the Protozoa. Lawrence: Allen Press, 74—88
- Inouye I, 1990. *Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim. In: Fukuyo Y, Takano H, Chihara M *et al* ed. Red Tide Organisms in Japan—An Illustrated Taxonomic Guide. Tokyo: Uchida Rokakuho Co. Ltd, 366—367
- Jahnke J, 1989. The light and temperature dependence of growth rate and elemental composition of *Phaeocystis globosa* Scherffel and *P. pouchetii* (Har.) Lagerh in batch cultures. Netherlands J Sea Res, 23:15—21
- Kaya K, Sano T, Watanabe M M *et al*, 1993. Thioic O-acid ester in sulfolipid isolated from freshwater picoplankton cyanobacterium *Syneschococcus* sp. Biochim Biophys Acta, 1169:39—45
- Mitsui A, Rosner D, Goodman A *et al*, 1988. Hemolytic Toxins in Marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp. In: Okaichi T, Anderson D M, Nemoto T ed. Red Tides Biology Environmental Science and Toxicology. New York, Amsterdam, London: Elsevier, 367—370
- Myklestad S M, 1995. Release of Extracellular Products by Phytoplankton With Special Emphasis on Polysaccharides. In: Vollenweider R A, Rinaldi A ed. Marine Mucilages. Sci Total-Environ, 165:155—164
- Sourmia A, 1988. *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae): How many species? Nova Hedwigia, 47:211—217
- Yang Hefu, Metagart A R, Davidson A *et al*, 1992. Productivity of acrylic acid and dimethyl sulfide during a summer bloom of *Phaeocystis pouchetii* in Antarctic coastal water. Antarct Res, 4(2):36—43
- Yasumoto T, Seino N, 1987. Toxins produced by benthic dinoflagellates. Biol Bull, 172:128—131

## MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND TOXINS OF *PHAEOCYSTIS* CF. *POUCHETII* (PRYMNESIOPHYCEAE)

HE Jia-wan, SHI Zhi-xin, ZHANG Yin-hua, LIU Yong-ding

(*Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072*)

JIANG Tian-jiu, YIN Yi-wei, QI Yu-zao

(*Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou, 510632*)

**Abstract** A heavy algal bloom of harmful and toxic *Phaeocystis* cf. *pouchetii* occurred in the coastal water of Southeast China in the autumn of 1997.

Two different morphotypes of *Phaeocystis* cf. *pouchetii* were observed. One was non-motile spherical colonies with a multitude of cells (103—104) disposed around the periphery and surrounded by a gelatinous covering. The colonies varied in size from 10mm to 30mm in diameter. Cells in the colony measured 3—7.5 $\mu$ m and had 2—3 chloroplasts. The other was motile spherical single cells, each possessing two almost equal flagella and a short haptonema.

Toxins were obtained from *Phaeocystis* cf. *pouchetii* cells through lyophilization and extraction with various organic solvents and assayed in terms of their activity on bovine erythrocytes. The results show that *Phaeocystis* cf. *pouchetii* contained hemolysin. The hemolysin was separated into five components by silica-gel column chromatography, among which the most potent component was identified as a mixture of glycolipids, with the major constituent of 1'-O-heptadecadienoyl-3'-O-(6-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-glycerol.

**Key words** Algal bloom *Phaeocystis* Morphological characteristics Hemolysin

**Subject classification number** Q946