

海洋微生物毒素研究进展

Advance in research of marine microbial toxins

王 新, 郑天凌, 胡 忠, 苏建强

(厦门大学 生命科学学院 应用与环境微生物研究所, 福建 厦门 361005)

中图分类号: Q938.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096 (2006) 07-0076-06

浩瀚的海洋世界具有高盐、高压、低温、寡营养等诸多特点。海洋中生存着丰富多样的海洋微生物, 它们产生了多种多样的生物活性物质, 如生物信息物质、药用活性物质、海洋生物毒素和生物功能材料等^[1]。其中海洋生物毒素是当前研究中的一个热点, 它具有化学结构多样、分子量小、生物活性高及作用机理独特等诸多特点。几乎所有的海洋生物种类都有产毒的个体, 近年来的研究表明, 作为一个庞大的类群, 海洋微生物产毒种类繁多, 如细菌、真菌、放线菌以及微藻等^[2]。与此同时人们还发现海洋微生物与其它的一些生物毒素之间存在着复杂的关系, 研究较多的河豚毒素源于微生物的观点已逐渐为人们所接受^[3,4]。和其它的毒素一样, 微生物毒素既有对人类有害的一面, 也有造福人类的一面, 而微生物毒素在进一步研究利用中的优势地位也使人们对其投注了更多的目光。作者拟就海洋微生物毒素的产毒种类、毒素特点、检测方法以及资源化利用等方面作一简要综述。

1 海洋微生物毒素的产毒种类

产毒素的海洋微生物有细菌、真菌、放线菌以及微藻等, 它们产生的毒素按其化学结构来分主要有肽类、胍胺类、聚醚类和生物碱等。细菌是了解相对较多的一个类群, 目前已报道的能够产生毒素的细菌主要分布在以下 10 个属: 假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、弧菌属 (*Vibrio*)、发光杆菌属 (*Photobacterium*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)、邻单胞菌属 (*Plesiomonas*)、交替单胞菌属 (*Alteromonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、棒杆菌属 (*Corynebacterium*) 和莫拉氏菌属 (*Moraxella*)。分

离获得的毒素主要有: 河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX)、石房蛤毒素 (saxitoxin, STX) 和两种作用于交感神经的毒素 Neosurugatoxin 和 Prosurugatoxin^[5-8]。海洋真菌也可产生真菌毒素。霉菌是主要的产毒类群, 可产生一类属于单端孢霉烯族化合物的霉菌毒素 (trichothecenes)^[9]。总的来说产毒真菌主要分布在以下 4 属: 青霉属 (*Penicillium*)、镰刀霉属 (*Fusarium*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 和麦角属 (*Claviceps*), 分别产生青霉毒素、镰刀霉毒素 (fusarium toxin)、黄曲霉毒素 (aflatoxin) 和麦角生物碱 (ergot alkaloids)^[10]。放线菌几乎都可产生生物活性物质, 从某种意义上来说, 产生的抗生素即是一种毒素。研究发现放线菌中的链霉菌属 (*Streptomyces*) 有的可产生河豚毒素^[11]及放线菌素 D。而肝色链霉菌 (*Streptomyces hepaticus*) 产生的洋橄榄霉毒素则是一种诱癌的急性强性毒素。蓝细菌在海洋中主要分布在热带海洋。它有很多种类主要产生两类毒素, 一种是属生物碱的神经毒素——变性毒素 a (anatoxina); 另一种是肽类毒素——肝毒素, 是一族至少包括 53 种有关的环状肽, 由 7 种氨基酸组成的肽叫微囊藻素 (microcystin), 由 5 种氨基酸组

收稿日期: 2004-02-25; 修回日期: 2004-07-31

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (2001CB409710);

国家自然科学基金资助项目 (40206015, 30370276)

作者简介: 王新 (1979-), 男, 河南南阳人, 在读博士, 主要从事海洋环境微生物研究; 郑天凌, 通讯作者, E-mail: wshwzh@jingxian.xmu.edu.cn

成的肽叫节球藻素 (nodularin)^[12-14]。海洋微藻也是产毒种类较多的一个类群, 主要分布在甲藻、金藻、绿藻、褐藻和红藻 5 门。其中甲藻是研究较多的一类, 除因它是重要的赤潮种之外, 其产生的重要的剧毒性海洋毒素也是引起研究人员关注的原因之一, 如产生麻痹性贝毒素的膝沟藻属 (*Gonyaulax* sp.) 产生神经性贝毒素的短裸甲藻 (*Gymnodinium breve* Davis) 和产生西加鱼毒素(ciguatoxin, CTX)的冈比亚毒藻 (*Gambierdiscus* sp.) 等。金藻中小定鞭金藻 (*Prymnesium parvum*) 产生的定鞭金藻素 (Prymnesin) 具有细胞毒性、鱼毒性、溶血和解痉作用。硅藻可产生肽类神经毒素软骨藻酸^[15]。挪威 Stabell 等^[16]在棕囊藻 (*Phaeocystis pouchetii*) 的提取物中发现了有溶血毒性、麻醉特性和鱼毒性的毒素。绿藻中发现的 caulerpenyne 是一种具有细胞毒性的倍半萜, 在褐藻和红藻中也发现了一些产生具有细胞毒性的萜类物质, 具有很高的潜在利用价值。

2 海洋微生物毒素的特点、产毒及作用机理

2.1 海洋微生物毒素的特点

由上述可见海洋微生物产生的毒素种类繁多, 但它们有着某些共同的特点: (1) 化学结构新颖多样。海洋微生物较高的多样性, 使其毒素的化学构型远较陆地微生物丰富, 且因海洋生态环境的特殊性, 海洋中许多微生物毒素的化学构型又是独有的, 而这种多样性和新颖性对人类而言却极为重要。因此, 海洋的确是人类药用资源的宝库^[17,18]。(2) 作用机理特殊。除了一些和陆地微生物相同的作用之外, 海洋微生物毒素很显著的一个特点是其主要作用于神经和肌肉可兴奋细胞膜上的电压依赖性离子 (如 Na^+ 、 Ca^{2+} 等) 通道。从而阻滞、干扰和破坏对生命过程起重大作用的“信息物质”的扩散和传递, 引发一系列的药理和毒理作用及严重的中毒过程。(3) 毒性强烈, 生物活性高。海洋微生物毒素对受体作用具有高选择性和高亲和性, 因而很少的量就可以起到巨大的作用。如河豚毒素的毒性是 NaCN 的 1 250 倍, 对人的致死量仅为 0.3 mg。(4) 较易于合成。部分海洋微生物毒素为低分子化合物或者低肽类物质, 使其工业化生产成为可能^[1, 19]。

2.2 海洋微生物的产毒机理

微生物产毒的机理一直是人们探索的目标, 至今

人们对它的了解仍非常有限。从微生物自身来说, 毒素可能是微生物在适应环境时的一种生理反应, 或者说是在生存竞争中占据优势而产生的“武器”。因为许多毒素是微生物在非正常生理条件下, 或者受到环境胁迫时才产生, 可涉及到相关基因的表达。但作为一种次级代谢产物, 也有学者认为毒素的产生可能是微生物正常生理过程, 产生毒素是其调节自身生长和生理状态的结果。巨大鞘丝藻 (*Lyngbya majuscula*) 次级代谢产生的多种化学结构的毒素就涉及到其基因簇的不同生理表达^[20]。然而有些产生毒素的微生物, 本身并不具有相关的基因, 却具有相关毒素转化的酶, 所谓产毒, 实际是一个转化的过程。而有些微生物的毒素成分就是其自身化学结构的一部分。还有人认为毒素并非微生物必需和必然的代谢产物, 其生物合成是不可预测的, 如在微藻的研究中发现, 同一地区、同一藻种中有毒和无毒的品系可以同时存在^[21]。从环境因素来说, 微生物产生毒素时受到多方面因素的影响, 如营养条件、pH、温度、生长状态、其他生物影响等。苏建强^[22, 23]在研究中发现, 塔玛亚历山大藻毒素的产生受营养盐消耗、pH 变化、藻细胞的个体生化水平、生长速率、温度和培养周期等多种因素影响。因此, 微生物产毒诱因及其产毒机制非常复杂, 有待人们进一步研究。

2.3 海洋微生物毒素的作用机理

海洋微生物产生的毒素, 除一些和陆地微生物毒素相同的作用机理外, 其独特之处在于它们专一性地作用于离子通道。由甲藻产生的聚醚类毒素的代表——西加鱼毒素是电压依赖性 Na^+ 通道的激动剂, 可增加细胞膜对 Na^+ 的通透性, 产生强去极化, 致使神经肌肉兴奋性传导发生改变。而另一类由海洋细菌和放线菌产生的毒素——河豚毒素则是 Na^+ 通道的阻滞剂, 结合在 Na^+ 通道外边, 从而阻塞 Na^+ 的通过。一些细菌和藻类产生的石房蛤毒素也属 Na^+ 通道的阻滞剂, 引起神经肌肉信号传导故障, 导致麻痹性中毒。此外蓝细菌产生的一些肽类毒素也可使 Na^+ 通道失活, 是作用强烈的神经毒素。另有一些毒素是作用于 Ca^{2+} 通道, 也有阻滞和激动两种作用^[19, 24, 25]。

3 海洋微生物毒素检测方法

3.1 常规检测技术

毒素的检测是在人们认识毒素的过程中不断发展的,常规的技术主要有生物、物理、化学检测技术^[26-30]。生物检测是最早出现的检测技术,主要是根据毒素对生物的毒性作用做定性的检测,经过多年的发展,现已成为一经典的常规技术。如美国分析化学家学会(AOAC)推荐的对海洋赤潮生物毒素检测的小鼠生物检测法是得到国际公认的毒素检测方法。另外还有人探索用猫、蚊子等作为检测生物,国内有研究人员尝试建立用泥鳅作为检测对象的生物检测法。生物检测法的优点是简便易行,不足之处在于只能进行定性检测,易受到外界因素影响。然而 Microtox 技术(MTX)却克服了生物检测方法的一些缺点,在环境毒性测定中有着广泛的应用。作者把它引进到海洋赤潮毒素的检测中,得到了较好的结果。近年来国外也有人在进行这方面的尝试^[31]。随着分析化学和工程技术的进步,一些分析方法的建立和精密仪器的出现,使得物理和化学检测方法得到迅速发展。如在 20 世纪 60~70 年代发展的化学方法、酸碱滴定荧光测定法,以及后来的高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱、色谱-质谱联用、毛细管电泳、X-射线结晶分析和核磁共振等。其中高效液相色谱(HPLC)是一种非常重要和在实验室常用的一种检测方法。这些方法有高灵敏、低检出限、速度快、可定性和定量等优点,但是价格昂贵,一些方法需要用的标准样品又较缺乏,故在实际中的应用受到限制。

3.2 新型检测技术

近 20 年来,人们对于毒素检测技术的研究取得了很大的进步,从化学、生理学、毒理学和分子生物学等角度出发,开发出一些新的毒素检测技术^[32-36]。海洋微生物毒素中一些和陆地共有的毒素的检测可以用相关的方法或作出改进,而其专一性地作用于离子通道的特点是新检测技术的理论依据。细胞毒性检测技术是利用毒素对 Na^+ 、 Ca^{2+} 等离子通道的作用所致的细胞毒性而进行检测的。其原理在于:细胞培养体系中加入离子通道活化剂后,离子内流过度,造成细胞肿胀甚至死亡;当加入了对离子通道有阻滞作用的毒素之后细胞即可存活,这样就可以确定毒素的存在,还可确定其量。已有人员已经开发出这方面的检

测试剂盒^[37,38]。神经受体检测技术是基于毒素和其受体的专一性的作用,其作用程度的高低体现于生物活性的大小。现已发展为受体竞争性置换分析(competitive displacement assay,CDA),检测限可达 0.6~0.8 ng。但是这种方法对仪器和费用要求高,因而限制了它的普遍应用。酶学检测技术主要是应用毒素对某些酶活性的抑制,通过影响酶对底物的降解来检测。酶的底物可以用荧光标记或者放射性标记,在确定酶和毒素关系的基础上,可以灵敏地检测出毒素含量,是一种操作简便、廉价,极具商业前景的新技术。免疫检测技术是备受关注的一种分子技术^[39],利用抗原与抗体结合的特异性、专一性和灵敏性的特点,对毒素进行快速的定性和定量测定。由于单(多)克隆抗体技术的成熟,获取毒素的免疫抗体已成为可能,相信不久的将来,对各种毒素进行检测的商品化试剂盒也会不断出现。这种新技术目前遇到的困难是毒素标准样品的获得、产生抗体的交叉反应和检测中受到结构类似物的假阳性干扰。生命科学的研究已经处于分子时代,对于海洋微生物毒素的分子生物学手段的检测也是研究人员努力的目标,分子检测手段原理不同,优点不一,但就目前的研究结果来看,分子检测技术有着无可比拟的优点和广阔的应用前景。总的来说,毒素检测技术的目标是向着定性、定量和快速、准确、低成本的方向发展。

4 海洋微生物毒素和其它生物毒素之间的联系

4.1 微生物毒素和其它生物毒素的联系

海洋环境中的毒素多种多样,几乎在从低等的微生物到植物及一些大型的海洋动物中广泛存在。在对这些毒素的认识过程中人们发现,一些海洋生物毒素并不是由自身产生的。如有人发现,在热带海洋中的一种有毒的珊瑚虫,其毒素是由其表面一种共附生的微生物产生的。海洋水产品毒素,如鱼毒和贝毒,其真正的来源是海洋微生物。有名的河豚毒素,随着近些年来从其它水生生物上陆续得到和多种属产毒细菌的发现和分离,河豚毒素的微生物来源说的观点已经为大多数学者所接受。贝毒素的来源则是海洋微藻,还可能是一些细菌和放线菌,主要是通过食物链积累的。近年来对海洋环境中共附生微生物的研究也取得了很大的成果,一些活性物质的产生机制也得以阐明,它使人们对一些包括毒素在内的海洋活性物质

的产生过程有了新的了解,然而这方面的认识仍远远不足。对海洋中生物毒素真正来源的探索仍是十分重要和有意义的工作,如今已经引起了人们的极大兴趣。

4.2 赤潮生物毒素产源

赤潮毒素大多是由海洋微藻产生的,然而在近些年的研究中,发现细菌、放线菌和真菌与微藻的产毒有着一定的联系。西加鱼毒素现在认为是由冈比亚毒藻产生的,但也有研究人员发现一种细菌的量和冈比亚毒藻产毒量成正相关。经抗生素除菌处理后的尖刺拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia pungens*),其产毒能力却急剧下降^[8],似乎细菌和微藻的产毒有着一定的关系。而可独自产生赤潮毒素的海洋细菌和放线菌的分离则使得人们对赤潮毒素的产毒根源有了新的认识,作者认为应加强对菌藻关系的研究,这是当前赤潮科学研究中的重要方向。

麻痹性贝毒素是一种危害较大的赤潮毒素,塔玛亚历山大藻是该毒素的产毒藻。而对于毒素真正产源尚存在争议,是藻自主产毒,共生微生物产毒,抑或还是在微生物作用下藻产毒?麻痹性贝毒素是聚醚类毒素,因此无法通过毒素直接得到 cDNA,也无法直接在基因组上定位产毒基因。有研究表明在实验室培养的藻在有些时候会丧失产毒的能力,似乎在藻本身来说并不存在产毒的基因。而可以产生麻痹性贝毒素重要种类石房蛤毒素的微生物的发现和分离,也使得细菌产毒有了进一步的证据。然而, Sako 等 1995 年研究结果表明麻痹性贝毒素的产生可伴随染色体稳定遗传,除早期 Silva 的研究之外,多年来很少有在塔玛亚历山大藻细胞中发现完整细菌细胞的报道。作者在前期的实验研究中,对塔玛亚历山大藻进行电镜观察时也未发现细菌的存在,同时发现多种环境因素对塔玛亚历山大藻产毒都有影响。相对于细胞内稳定环境而言,藻受到的外界环境影响是比较大的,因而可以理解是环境因素影响藻的产毒,而不是藻内细菌。所以作者认为,毒素的产毒基因在藻基因组中是存在的,而某些细菌存在产毒基因也是可能的。至于细菌和藻类在产毒过程中复杂的相互关系,以及毒素产生的机制,只能在产毒藻真正无菌化这一难题得以解决之后才能得以科学阐明。

5 海洋微生物毒素利用

5.1 海洋微生物毒素的资源利用

毒素带给人类的是危害和难以估量的损失,但随着认识的深入,其潜在的应用价值吸引着人们去开发

和利用。目前的研究着重对毒素在神经系统、心血管系统、抗肿瘤等方面的作用进行药物开发。河豚毒素和神经、肌肉、浦肯野纤维等可兴奋细胞膜上的专一性受体相结合后,通过“关闭机制”使通路关闭,从而阻滞细胞的兴奋和传导。这种作用被用于镇痛、解痉、局部麻醉和降压等治疗过程,与传统药物相比,药效极强且不具成瘾性。这些特点使它成为一种极其珍贵的药物,有很高的经济价值,每千克近 2 亿美元。国内外均有相关机构对该毒素做应用开发研究。石房蛤毒素和河豚毒素具有相似的作用,已开发为局部麻醉用药物,药效比普通卡因或可卡因强 10 万倍,且不会成瘾。西加鱼毒素作用于 Na^+ 通道后产生强去极化,增加 Na^+ 对膜兴奋时的渗透性,动物试验表明它能兴奋交感神经纤维使心率加快、心脏收缩力增强,可开发做强心剂。其它如定鞭金藻毒素等毒素,具有抗菌和溶血作用,有望用作心血管疾病的治疗药物。另外,由于海洋生物毒素特殊的作用位点和机理,它们在基础药物学和神经生理学研究也是不可多得的工具药,在 Na^+ 、 Ca^{2+} 通道的鉴定、分离和结构功能研究中起到过很大的作用^[1, 40-42]。

海洋微生物毒素在资源利用中有着很大的优势。复杂而独特的海洋环境中的微生物具有遗传、生理和产毒多样性,提供丰富应用微生物资源的同时也为药物开发提供了结构特殊、作用机理独特的毒素。此外,微生物分离、培养、改造和发酵技术的成熟使得可利用毒素的大量获取成为可能,而基因工程手段和生物化学的发展,使得人们对分子量低、易合成毒素的改造利用更加容易。因而微生物毒素的资源利用前景光明。

5.2 防范微生物毒素在军事和恐怖活动中的应用

近年来的一些生物恐怖和有关生化战剂的事件加深了人们对毒素被滥用的担忧,也促使人们开展相关领域的研究^[43-46]。包括微生物毒素在内的海洋生物毒素毒性强、毒理作用特殊、难防难治和易于生产的特点使它们成为第三代生化战剂的当然之选,而早在第二次世界大战之前,国外已对海洋生物毒素作过广泛的调查研究。在海洋微生物产生的毒素中,黄曲霉毒素、石房蛤毒素、河豚毒素和西加鱼毒素尤为引人关注^[1, 47]。因此,出于我国自身安全考虑,加强毒素在军事应用和防范领域的研究是十分必要和迫切的。生物恐怖活动社会危害性极大,然而从技术角度来

说,恐怖活动所用到的微生物和毒剂易于获取且难以控制,因为一个合法的、小型的微生物研究机构和医疗机构完全有可能成为恐怖分子的生产基地。如何防范和控制微生物毒素在战争及恐怖活动中的破坏作用,是一个值得深入研究的新课题。

面对浩瀚的海洋世界,迄今人们的认识仍非常有限。海洋微生物毒素的研究是 21 世纪海洋研究开发及治理中一个非常重要的领域,而中国在该领域的研究基础还相当薄弱,着眼于中国国民健康和国家安全,国家应加大对海洋微生物毒素研究的投入,以拓展和深化该领域的研究,努力提高中国在此领域的竞争力。

参考文献:

[1] 宋杰军,毛庆武.海洋生物毒素学[M].北京:北京科学技术出版社,1996.3-4.

[2] 林永成.海洋微生物及其代谢产物[M].北京:化学工业出版社,2002.1-27.

[3] 于瑞莲,王琴.河豚毒素的生物合成[J].中国海洋药物,2002,4:40-42.

[4] Simdu U,Noguchi T, Wang Deng-wu,*et al.* Marine bacteria which produce tetrodotoxin[J].**Applied and Environmental Microbiology**, 1987,**53**(7):1 714.

[5] 刘全永,胡江春,薛德林,等.海洋微生物生物活性物质研究[J].应用生态学报,2002,**13**(7):903-904.

[6] Kosuge T,Tsuji K, Hirai K, *et al.* First evidence of toxin production by bacteria in a marine organism [J] . **Chem Pharm bull**, 1985, **33** (16) :3 059-3 061.

[7] Takuo K,Kuniro T,Koichi H.Isolation and structure determination of a new marine toxin,neosurugatoxin,from the Japanese Ivory Shell,*Babylonia japonica* [J].**Tetrahedron Letters**,1981,**22** (35) : 3 417-3 420.

[8] 林伟,周名江.赤潮藻产毒过程中海洋细菌的作用[J].海洋科学,2001,25(3):34-38.

[9] Kimura M, Anzai H, Yamaguchi I. Microbial toxins in plant-pathogen interactions: Biosynthesis, resistance mechanisms, and significance[J]. **Journal of General and Applied Microbiology**,2001,47(4):149-160.

[10] 刑来君,李明春.普通真菌学[M].北京:高等教育出版社,1999.160-165.

[11] Simidu U,Kita-Tsukamoto K,Yasumoto T,*et al.* Taxonomy of four marine bacterial stains that produce tetrodotoxin[J]. **International Journal of Systemtic Bacteriology**,1990,

40(4): 331-336.

[12] Codd G A. Cyanobacterial toxins: occurrence,properties and biological significance[J].**Water Science Technology**, 1995,**32**(4):149-156.

[13] Dahlmann J,Budakowski W R,Luckas B.Liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins[J]. **Journal of Chromatography A**, 2003, **994**(1-2): 45-57.

[14] 陈宁庆.实用生物毒素学[M].北京:中国科学技术出版社,2001.205-207.

[15] Lizzy M.Domoic acid:a fascinating marine toxin[J]. **Environmental Toxicology and Pharmacology**,2001,**9**(3):79-85.

[16] Stabell O B,Randi T A,Hans C E.Toxic peculiarities of the marine alga *Phaeocystis pouchetii* detected by in vivo and in vitro bioassay methods[J].**Aquatic Toxicology**,1999, **44**(4):279-288.

[17] Carte B K.Biomedical potential of marine natural products [J]. **Bioscience**, 1996, **46**(4):271-286.

[18] Shimizu Y.Microalgae as a drug source[A]. Fusetani N. Drugs from the Sea[C].Basel:Karger,2000.30-45.

[19] 吴梧桐,王友同,吴文俊.海洋活性物质研究若干进展[J].药物生物技术,2000,7(3):179-183.

[20] Yu Zu-ru ,Shi Mi-zu. Microalgal metabolites[J]. **Current Opinion in Microbiology**, 2003,**6** (3) :236-243.

[21] 周成旭,严小军.赤潮生物的毒害机理与毒素生物化学研究[J].海洋科学,2000,24(5):23-24.

[22] 苏建强,郑天凌.海洋细菌对赤潮藻生长及其产毒作用量的影响[J].海洋与湖沼,2003,34(1):44-49.

[23] 苏建强,郑天凌,胡忠,等.不同 pH 和盐度下海洋细菌对赤潮藻生长和产毒的影响[J].应用生态学报,2003,14(7):1161-1164.

[24] 陈慧萍,吴文言,徐安龙.海洋肽类活性物质研究概况[J].海洋科学,2001,25(11):25.

[25] Leigh L,Richard J L. Ciguatera: recent advances but the risk remains[J]. **Food Microbiology**,2000,**61**(2-3):91-125.

[26] 曾呈奎,相建海.海洋生物技术[M].济南:山东科技出版社,1998.416-425.

[27] Paulo V,Maria A M S.Evaluation of marine biotoxin's

- accumulation by *Acanthocardia tuberculatum* from Algarve, Portugal[J]. **Toxicon**, 2002, **40** (5) :511–517.
- [28] George J, Jackson I, Kaye W. The US Food and Drug Administration's selection and validation of tests for food borne microbes and microbial toxins[J]. **Food Control**, 1996, **7**(1):37–39.
- [29] Goto H, Igarashi T, Yamamoto M, et al. Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by Liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. **Journal of Chromatography A**, 2001, **907**(1–2):181–189.
- [30] Indrasena W M, Gill T A. Storage stability of paralytic shellfish poisoning toxins[J]. **Food Chemistry**, 2000, **71**(1): 71–77.
- [31] Melissa L, Derby, Michael G, et al. Studies of the effect of Ψ -APONIN from *Nannochloris* sp. on the Florida red tide organism *Karenia brevis*[J]. **Toxicon**, 2003, **41**(2):245–249.
- [32] Martha L H, Bradley G S. Detection of *Clostridium perfringens* alpha toxin using a capture antibody ELISA[J]. **Toxicon**, 1999, **37** (3) :471–484.
- [33] Corinne R, Marie-Claire H. Potential of immunoextraction coupled to analytical and bioanalytical methods(liquid chromatography, ELISA kit and phosphatase inhibition test) for an improved environmental monitoring of cyanobacterial toxins[J]. **Analytic Chimica Acta**, 1999, **399**(1–2):75–87.
- [34] Hallegraeff G M. Manual on harmful marine microalgae UNESCO[R]. France: IOC Manuals and Guides 1995, **33**:182–199.
- [35] Kerr D S, Briggs D M, Saba H I. A neurophysiological method of rapid detection and analysis of marine algal toxins[J]. **Toxicon**, 1999, **37** (12) :1 803–1 825.
- [36] Fasano A, Nataro J P. Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins[J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2004, **56** (6) :795–807.
- [37] Vélez P, Sierralta J, Alcayaga C, et al. A functional assay for paralytic shellfish toxins that uses recombinant sodium channels[J]. **Toxicon**, 2001, **39**(7):929–935.
- [38] Byeung S C, Michael L, Tetsuhito H, et al. Use of a channel biosensor for the assay of paralytic shellfish toxins [J]. **Toxicon**, 1998, **36**(10):1371–1381.
- [39] Mountfort D O, Suzuki T, Truman P. Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels[J]. **Toxicon**, 2001, **39**(2–3):383–390.
- [40] Lewis R J. Negative inotropic and arrhythmic effects of high doses of ciguatoxin on guinea-pig atria and papillary muscles[J]. **Toxicon**, 1988, **26**(7):639–649.
- [41] Gusovsky F, Daly J W. Maitotoxin: a unique pharmacological tool for research on calcium-dependent mechanisms[J]. **Biochem Pharmacol**, 1990, **39**(11): 1 633–1 639.
- [42] 胡延春, 贾艳, 张乃生. 生物毒素应用研究[J]. 生物技术通讯, 2004, **15** (1) : 83–85.
- [43] Hilleman M R. Overview: cause and prevention in biowarfare and bioterrorism[J]. **Vaccine**, 2002, **20** (25–26) : 3 055–3 067.
- [44] Lane H C, Montagne J L, Fauci A S. Bioterrorism: a clear and present danger[J]. **Nature Medicine**, 2001, **7** (12): 1 271–1 273.
- [45] Knight J. US rejects bioweapon inspections [J]. **Nature**, 2001, **412**(6 845):365.
- [46] Hassani M, Patel M C, Pirofski L. Vaccines for the prevention of diseases caused by potential bioweapons[J]. **Clinical Immunology**, 2004, **111** (1) : 1–15.
- [47] 王磊, 王松俊. 生物毒素的军事意义[J]. 卫生研究, 1998, **27** (增刊) : 155–157.

(本文编辑:张培新)