

# 亚历山大藻溶血毒性的初步研究

谭志军<sup>1,2</sup>, 颜天<sup>1</sup>, 于仁成<sup>1</sup>, 周名江<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境重点实验室, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:**研究了 11 株亚历山大藻(*Alexandrium* spp.)的溶血毒性,其中 7 株亚历山大藻具有显著的溶血毒性,说明溶血毒性在亚历山大藻中具有一定的普遍性,但各亚历山大藻藻株溶血毒性的大小与其所产麻痹性贝类毒素(Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)的能力无直接关系;针对性地研究了一株典型 PSP 产毒甲藻——塔玛亚历山大藻(*A. tamarense*, ATHK 株)的溶血毒性特点,该株亚历山大藻具有较强的溶血毒性,指数期单个藻细胞的溶血毒性大小约相当于 4  $\mu$ g 皂素的溶血能力,而且其溶血毒性的大小与藻的生长阶段和细胞密度都有一定关系:指数期的溶血毒性最大;藻细胞、细胞碎片、细胞内容物都有一定的溶血毒性,其中细胞碎片的毒性最大;研究还表明一种 PSP 标准品 STX 毒素并没有溶血毒性,进一步说明亚历山大藻产生的溶血毒性是其他非 PSP 物质造成的,这类溶血毒素对人类健康和生态环境的影响值得关注。

**关键词:**亚历山大藻(*Alexandrium* spp.); 血细胞; 溶血毒性

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)12-0075-07

亚历山大藻(*Alexandrium* spp.)是一类在全球分布较广,危害较严重的有毒甲藻,其中一些藻株可以产生麻痹性贝类毒素(Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)<sup>[1,2]</sup>。PSP 能选择性阻断电压门控 Na<sup>+</sup> 通道,导致动作电位无法形成,从而对生物或人类造成危害。当这类甲藻爆发赤潮时,能够导致现场生物的大量死亡<sup>[2-6]</sup>。而且 PSP 被水产品富集后也可能导致食用者中毒<sup>[7,8]</sup>,主要中毒症状表现为面部、肢端麻木,恶心,严重的会因呼吸肌麻痹而死亡。

研究发现亚历山大藻除通过产生 PSP 毒素、机械方式或耗氧窒息<sup>[9-11]</sup>作用对鱼类等海洋生物的存活造成影响外,还可以通过产生其他非 PSP 物质如溶血性毒素和细胞性毒素对海洋生物造成危害<sup>[12]</sup>。研究者认为这种溶血毒性作用是由其他非 PSP 物质产生的<sup>[13,14]</sup>,但其是否与 PSP 存在一定关系目前还不清楚。

近年来,中国的赤潮问题日益严重,其中亚历山大藻赤潮具有由南向北逐渐扩展的趋势。近年调查发现,在中国舟山海域附近连续发生大规模的东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)赤潮和米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)赤潮,同时伴随有大面积的亚历山大藻(*Alexandrium* spp.)赤潮,初步分析表明该藻能够产生 PSP<sup>[15]</sup>。亚历山大藻除产生 PSP 毒素外,其是否可能产生其他的有毒有害物质而对海洋生态环境造成影响,值得关注和研究。因此本实验中,作者首先对 11 株亚历山大藻的溶血毒性进行了比较,并较深入地研究了一株分离自中国南海

海域、典型的 PSP 产毒藻——塔玛亚历山大藻(*A. tamarense*, ATHK 株)的溶血毒性,希望全面了解亚历山大藻的毒性,准确评价这类有毒赤潮的危害,为赤潮的有效管理提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

所用 11 株亚历山大藻 *Alexandrium* 藻株有:塔玛亚历山大藻 *A. tamarense*(ATHK、AT5-1、AT5-3、ATCI02、ATCI03)、微小亚历山大藻 *A. minutum*(AM-1)、*A. lusitanicum*(AL-1)、链状亚历山大藻 *A. catenella*(ACDH)以及 3 株不产 PSP 毒素的亚历山大藻 *Alexandrium* spp. (AC-1、AS-1)和塔玛亚历山大藻 *A. tamarense*(AT-6)。所有 11 株亚历山大藻分别在三角烧瓶内以 f/2 培养液进行单种培养,温度 20  $\pm$ 1  $^{\circ}$ C,光照 52  $\mu$ E/(m<sup>2</sup>·s),光暗比为 14 h : 10 h。

新鲜人血液取自于青岛市肿瘤医院,用于检验亚历山大藻的溶血毒性,抽取后立即加 5%抗凝因子

收稿日期:2007-01-15;修回日期:2007-05-08

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-208);国家重点基础研究项目(2001CB409700);NSFC-广东联合基金项目(U0733006)

作者简介:谭志军(1978-),男,博士研究生,研究方向:有害赤潮生态毒理学, E-mail: zhijuntandy@163.com;颜天,通讯作者,研究员, E-mail: tianyan@ms.qdio.ac.cn

防止血液凝固,加入等体积等渗盐缓冲液于4 冰箱保存,并在7 d内完成实验。

## 1.2 方法

### 1.2.1 血细胞的制备及标准反应体系的建立

实验前取血液溶于10倍体积4 保存的等渗盐溶液(氯化钠 73 mol/m<sup>3</sup>,柠檬酸钠 42 mol/m<sup>3</sup>,葡萄糖 114 mol/m<sup>3</sup>用柠檬酸调pH至5.0)。低速离心5 min(1 000 r/min)弃上清液,重复3次,然后将血细胞稀释至OD540 nm约为0.8时备用<sup>[13,14,16]</sup>。

配置20 mg/L的标准皂素水溶液,按照浓度梯度取样使各反应体系分别含0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.5、2、2.5 mg/L,与2 mL等渗盐溶液以及经上述处理的新鲜血细胞1 mL充分混合后作为标准反应体系,每浓度组设6个平行,首先测量溶血前反应体系在540 nm处的吸光度,然后将反应体系置于30水浴中反应60 min,2 500 r/min离心5 min,吸取上清液,540 nm波长测光吸收度。

根据溶血前后吸光度的变化计算血细胞溶解率,溶血率=(溶血后吸光度/溶血前吸光度)×100%,并以皂素浓度为横坐标,溶血率为纵坐标作图(图1),建立皂素和溶血率的标准曲线,并以此建立的实验方法作为标准反应体系。一个溶血素单位指的是:在1 mL标准反应系统中(含等渗液、血球、溶血毒素,混合后pH为5.0)使血细胞溶解50%时所需毒素的量。

### 1.2.2 11株亚历山大藻溶血毒性的比较

实验前,各取2 mL实验室培养的11株亚历山大藻指数期藻样以鲁哥氏液固定后,用计数框在显微镜下计数,记录藻细胞密度。然后抽滤11株亚历山大藻各100 mL到GF-C滤膜上,收集藻细胞,冰箱-20 冷冻保存备用。实验时用0.05 mol/L的乙酸提取,超声破碎后静置10 min,然后以1×10<sup>4</sup> r/min离心15 min,取上清液用于实验。在标准反应体系中测各藻株不同体积乙酸提取物(均相当于5.0×10<sup>4</sup>个细胞)的溶血毒性,另外以STX毒素标准品以及0.05 mol/L的乙酸作为对照。

### 1.2.3 塔玛亚历山大藻(ATHK株,以下简称ATHK)的溶血毒性

#### 1.2.3.1 指数期不同数目ATHK藻细胞内容物溶血毒性

取2 mL ATHK指数期的藻样以鲁哥氏液固定,用计数框在显微镜下计数,记录藻细胞密度。收集指数期的ATHK藻细胞,超声破碎静置10 min,然后以1×10<sup>4</sup> r/min转速离心15 min,取上清液,在标准反应体系中分别加入不同体积的上清液(分别相

当于6.5×10<sup>4</sup>、1.3×10<sup>5</sup>、2.6×10<sup>5</sup>、3.9×10<sup>5</sup>个细胞的内容物),然后以等渗盐溶液补充到0.2 mL,测量指数期不同数目的细胞内容物对人血细胞溶血毒性的大小。

#### 1.2.3.2 不同生长期ATHK的溶血毒性

取不同生长期的ATHK培养液各200 mL,取2 mL记录密度后收集藻细胞到GF-C滤膜上,冰箱-20 冷冻保存备用。同样以0.05 mol/L的乙酸提取,超声破碎静置10 min后1×10<sup>4</sup> r/min离心15 min,上清液用于实验。在标准反应体系中测量上清液(不同生长期均相当于5.0×10<sup>4</sup>个细胞)的溶血毒性大小,同时以0.2 mL 0.05 mol/L的乙酸做对照。

#### 1.2.3.3 ATHK不同组分的溶血毒性

收集两份指数期的藻细胞各100 mL,记录藻细胞密度后,一份超声破碎静置10 min后以1×10<sup>4</sup> r/min离心15 min,沉淀为细胞碎片,上清液为内容物,另一份以筛绢过滤后得到完整藻细胞。用灭菌海水将细胞碎片、藻细胞和内容物稀释到相同细胞密度后进行溶血实验。在标准反应体系中分别加入0.2 mL藻细胞、细胞碎片、细胞内容物及标准毒素STX标准品,消毒海水和0.05 mol/L的乙酸作为空白对照,比较各组分溶血毒素活力的大小。

## 1.3 数据处理

采用Excel中的STDEV以及TTEST等进行数据处理和统计分析。

## 2 结果

### 2.1 皂素质量浓度与溶血率的关系曲线

根据建立的标准反应体系,得到皂素质量浓度和溶血率关系的标准曲线,结果如图1所示。

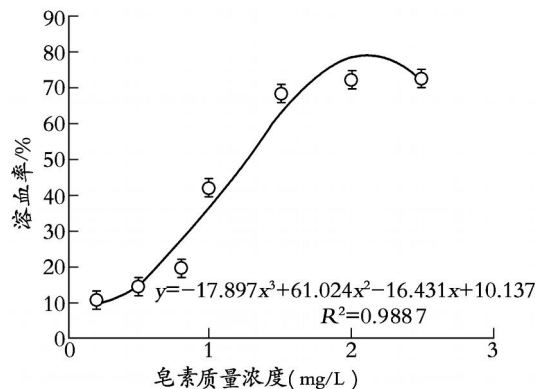


图1 皂素质量浓度与溶血率之间的关系

Fig. 1 Relationship between concentration of digitonin and hemolytic activity

由图 1 可以计算出本实验中约 1.25 μg 皂素为一个溶血素单位。

### 2.2 11 株亚历山大藻溶血毒性的比较

比较了 11 株亚历山大藻指数生长期的溶血毒性,结果如图 2 和表 1 所示。

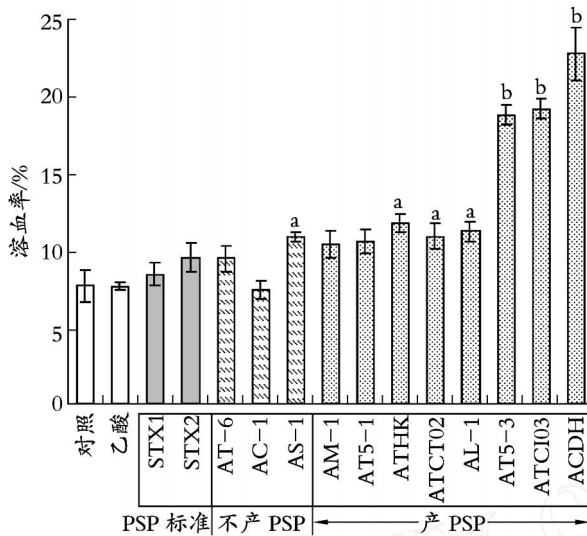


图 2 11 株亚历山大藻溶血毒性的比较

Fig. 2 The hemolytic activity of eleven *Alexandrium* strains 对照. 等渗盐溶液; 乙酸. 0.05 mol/L; STX1. 0.255 μg; STX2. 0.051 μg

PBS buffer is taken as control; The concentration of acetic acid is 0.05 mol/L, that of STX1 and STX2 are 0.255 μg and 0.051 μg, respectively

表 1 亚历山大藻的来源及产 PSP 状况

藻种	编号	PSP 毒性 <sup>[17]</sup>	溶血毒性大小	提供者/单位
<i>A. tamarensis</i>	ATHK	+++	++	暨南大学
<i>A. tamarensis</i>	ATCI02	+	++	暨南大学
<i>A. tamarensis</i>	ATCI03	+	+++	暨南大学
<i>A. tamarensis</i>	AT5-1	+++	+	暨南大学
<i>A. tamarensis</i>	AT5-3	+++	+++	暨南大学
<i>A. catenella</i>	ACDH	+	+++	赤潮 973 项目
<i>A. minutum</i>	AM-1	+	++	Dr. H. Chou
<i>A. lusitanicum</i>	AL-1	+	++	CCMP(1888)
<i>A. tamarensis</i>	AT-6	-	-	Dr. Anderson
<i>Alexandrium</i> sp.	AC-1	-	-	暨南大学
<i>Alexandrium</i> sp.	AS-1	-	++	暨南大学

注: + 表示产 PSP 毒素或有溶血毒性, - 表示不产生 PSP 毒素或无溶血毒性

由上述结果可以看出,和对照相比,虽然产 PSP 的亚历山大藻 AM-1 和 AT5-1 的溶血毒性不显著,但其他产 PSP 的亚历山大藻株如 AL-1、ACDH、ATCI03、ATCI02、AT5-3 以及 ATHK 都有很强的溶血毒性,大小依次为 ACDH > ATCI03 > AT5-3 > ATHK > ATCI02 > AL-1,其中溶血毒性最高的 ACDH(相当于 5 × 10<sup>4</sup> 个细胞)的溶血毒性大约相当于 0.49 μg 皂素的溶血毒性;而几株藻产 PSP 的能力大小依次为 ATHK > AT5-3 > AL-1 > ATCI03 > ACDH > ATCI02,说明亚历山大藻的溶血毒性大小与其产 PSP 的能力无直接关系;另外两种剂量 STX 标准品都未表现出溶血毒性,也说明 PSP 不存在对人血细胞的溶血毒性。因此,上述结果说明产 PSP 亚历山大藻对人血细胞的溶血毒性存在普遍性,而且溶血毒性大小与各藻株 PSP 产生能力并没有必然的联系,亚历山大藻对人血细胞的溶血毒性是非 PSP 物质作用的结果。

### 2.3 塔玛亚历山大藻(ATHK)的溶血毒性

#### 2.3.1 指数期塔玛亚历山大藻(ATHK)的溶血毒性

图 3 结果显示指数期塔玛亚历山大藻(ATHK)具有一定的溶血毒性,而且溶血能力大小随细胞数量的增多而增大,由图 3 可计算出在本实验标准反应体系中,大约 3.2 × 10<sup>5</sup> 个指数期 ATHK 藻细胞的溶血毒性为一个溶血素单位,相当于 1.25 μg 皂素产生的溶血能力,即单个藻细胞约等于 4 μg 皂素的溶血能力。

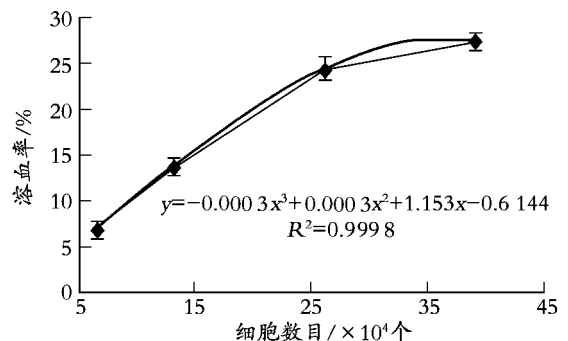


图 3 指数期不同数目塔玛亚历山大藻(ATHK)细胞的溶血毒性

Fig. 3 The hemolytic activity of different numbers of *A. tamarensis* (ATHK)

#### 2.3.2 不同生长时期塔玛亚历山大藻(ATHK)的溶血毒性

比较了不同生长时期的塔玛亚历山大藻(ATHK)的溶血毒性大小,结果如图 4 所示。

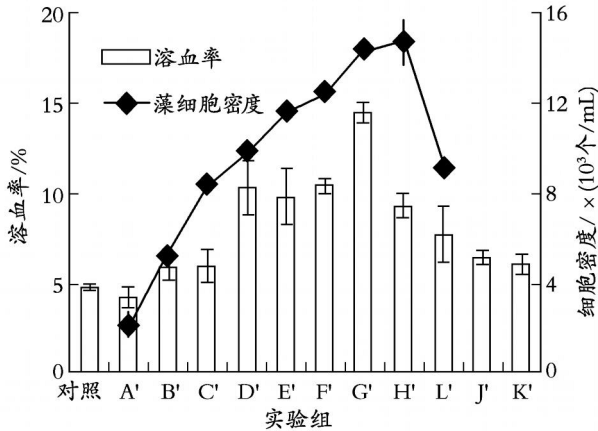


图 4 不同生长时期塔玛亚历山大藻(ATHK)的溶血毒性  
Fig.4 The hemolytic activity of *A. tamarense*(ATHK) at the different growth stages

对照为 0.05 mol/L 乙酸, A~K 为各生长时期的 *A. tamarense*, 其中 J, K 分别代表半沉底和完全沉底的 *A. tamarense*

The 0.05 mol/L acetic acid is taken as control. A~K present *A. tamarense* at different growth phase

图 4 结果表明塔玛亚历山大藻(ATHK)在生长过程中都具有一定的溶血毒性,而且不同生长时期的溶血能力大小不同:随生长阶段的不同,塔玛亚历山大藻(ATHK)的溶血毒性也有一定的变化,指数期塔玛亚历山大藻(ATHK)的溶血能力最强,甚至几乎完全沉底的塔玛亚历山大藻(ATHK)仍然具有一定的溶血毒性,但大小远低于指数期的溶血毒性,说明溶血毒性与活性有关。

2.3.3 塔玛亚历山大藻(ATHK)各细胞组分的溶血毒性比较

图 5 显示了塔玛亚历山大藻(ATHK)完整藻细胞、细胞内容物、细胞碎片以及一种 PSP 成分 STX 毒素标准品对人血细胞的溶血毒性。

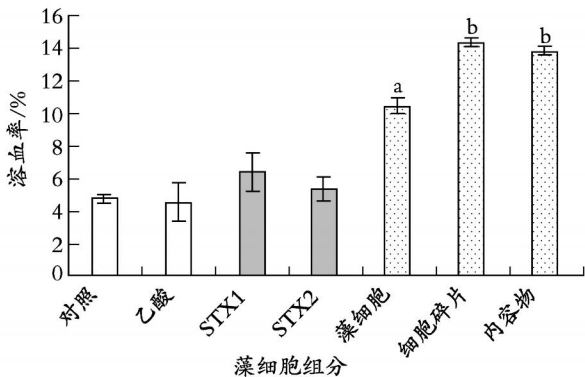


图 5 塔玛亚历山大藻(ATHK)细胞各组分的溶血毒性  
Fig.5 The hemolytic activity of different fractions of *A. tamarense*(ATHK)

对照为消毒海水;乙酸浓度为 0.05 mol/L; STX1:0.255 μg; STX2:0.051 μg

Sea water is taken as control; The concentration of acetic acid is 0.05 mol/L, that of STX1 and STX2 are 0.255 μg and 0.051 μg, respectively

图 5 结果表明,塔玛亚历山大藻(ATHK)细胞的各个组分都有一定的溶血作用,其中细胞碎片和内容物的溶血毒性最大,而完整藻细胞的溶血毒性反而最小,可能原因是细胞碎片和血细胞的接触几率远大于完整藻细胞,并且还表明 ATHK 细胞内外都存在具有溶血毒性的物质。但两种毒性大小显著差异的 STX 毒素标准品都没有表现出溶血毒性,说明塔玛亚历山大藻(ATHK)所产的 PSP 不产生溶血作用。因此塔玛亚历山大藻(ATHK)的溶血毒性应该是其他非 PSP 物质作用的结果。

图 5 中 STX1 的量为 0.255 μg,相当于 9.8 × 10<sup>4</sup>个塔玛亚历山大藻(ATHK)细胞产生的 PSP 毒素量,大约为 1.42 MU(鼠单位);而同样数目细胞内容物对血细胞的溶血率为 10.6%,相当于质量浓度为 0.1 mg/L 皂素产生的溶血能力。

3 讨论

亚历山大藻是一类典型的 PSP 产毒藻,由于其产生的 PSP 毒素对生物和环境所产生的巨大影响,因此早期研究者在关注这类赤潮藻的危害时,往往仅关注于 PSP 毒素的危害。然而近年来研究发现某些亚历山大藻如塔玛亚历山大藻 *A. tamarense*、链状亚历山大藻 *A. catenella* 等除了能够产生 PSP 之外,还可以产生其他的一些未知毒素或新毒素<sup>[14,18,19]</sup>。这些毒素对生物造成的危害主要表现在造成卤虫等生物死亡<sup>[13]</sup>,使血细胞溶解<sup>[13,14]</sup>、受精卵孵化率降低、胚胎畸形<sup>[19]</sup>以及鱼卵卵膜弹性下降、鱼鳃上皮肿胀、成空泡状等<sup>[12]</sup>。PSP 是一种细胞内毒素,而这些新毒素的产生部位往往位于细胞表面或排泄到细胞培养液中,故这些毒素被认为是其他一些非 PSP 物质的新毒素<sup>[12,19]</sup>。如 Simonsen 等<sup>[14]</sup>发现一株亚历山大藻(*A. tamarense*)具有显著的溶血毒性,但其纯化的 PSP 组分如 STX 和 GTX<sub>1-5</sub> 却不具有溶血毒性,因此认为这株亚历山大藻(*A. tamarense*)中的溶血毒性应是除 PSP 之外的其他毒素造成的。

溶血毒素是亚历山大藻产生的一类重要的新毒素,由于其对生物的显著影响已逐渐引起研究者的注意,目前已发现亚历山大藻中的 *A. tamarense*<sup>[14]</sup>、*A. catenella*<sup>[20]</sup>、*A. taylori*<sup>[13]</sup> 等藻株都能够产生一定的溶血性有毒物质。这些溶血毒素随亚历山大藻生长阶段的不同而改变,一般认为在藻类的指数生长阶段毒性最大<sup>[13,14]</sup>,但即使在衰老期有些亚历山大藻也具有溶血毒性<sup>[13]</sup>。另外温度、光照和 pH 值等外界环境也对亚历山大藻的溶血毒性产生显著影

响,如 37 时 *A. taylori* 产生的溶血素毒性最大,随着温度降低,毒性也随着降低,到 4 则不再有溶血毒性<sup>[13]</sup>。而且 Emura 等<sup>[13]</sup> 还发现亚历山大藻 *A. taylori* 的溶血毒性具有种间特异性,对不同哺乳动物血细胞的溶血程度不同,对兔和猪血细胞有很强的溶血毒性,但对人、羊和牛的溶血毒性则较弱。本实验结果表明产 PSP 的亚历山大藻 ACDH、ATCI03、AT5-3、ATHK、ATCI02、AL-1 普遍存在一定的溶血毒性,结合前人的研究结果表明溶血毒性在产 PSP 的亚历山大藻中是普遍存在的。

研究发现,亚历山大藻普遍产生溶血毒性,但不同藻株的毒性大小存在较大差别<sup>[13, 14, 21]</sup>。本实验中  $3.2 \times 10^5$  个指数生长期的塔玛亚历山大藻 (ATHK) 细胞与  $1.25 \mu\text{g}$  皂素产生的溶血毒性相当,而 Simonsen<sup>[14]</sup> 所用的塔玛亚历山大藻  $1.6 \times 10^6$  个藻细胞则相当于  $220 \mu\text{g}$  皂素的产生溶血毒性,高于本实验所用塔玛亚历山大藻 ATHK 株的溶血能力。另外 Arzul 等<sup>[21]</sup> 比较了 3 种亚历山大藻在各生长阶段所产抑制性物质的溶血毒性,发现指数期单细胞的溶血毒性大小依次为 *A. tamarense* > *A. catenella* > *A. minutum*,而且这 3 株亚历山大藻的溶血能力随生长阶段及细胞活性变化而改变。

除亚历山大藻<sup>[13, 14, 21]</sup> 外,其他有毒赤潮藻如凯伦藻<sup>[22-25]</sup> 及棕囊藻<sup>[16, 26-28]</sup> 也具有较强溶血毒素产生能力。如何家菀<sup>[16, 28]</sup> 通过现场采样的方式研究发现分布于中国的一类棕囊藻具有较高的溶血毒性,每克(湿质量)藻细胞经水和甲醇提取后,其溶血毒性分别相当于  $22.1 \mu\text{g}$  和  $42.9 \mu\text{g}$  皂素产生的溶血毒性。单个塔玛亚历山大藻 (ATHK) 细胞的干质量为  $2 \text{ ng}$ <sup>[29]</sup>,约为湿质量的 10%,所产毒素溶血能力相当于  $4 \text{ pg}$  皂素的溶血毒性。因此,每克(湿质量)塔玛亚历山大藻细胞的溶血毒性则相当于  $200 \mu\text{g}$  皂素的溶血毒性。刘洁生等<sup>[30]</sup> 发现实验室培养条件下,  $1.2 \times 10^8$  个球形棕囊藻细胞 (*Phaeocystis globosa* Scherffel) 产生的溶血毒性为 1 Unit (溶血单位), Peng<sup>[31]</sup> 则发现  $2.0 \times 10^8$  个球形棕囊藻细胞的溶血毒性为 1 Unit,而本实验中  $3.2 \times 10^5$  个塔玛亚历山大藻 (ATHK) 细胞的溶血毒性就相当于 1 Unit,所以塔玛亚历山大藻溶血毒性较棕囊藻高;另外 Neely 和 Campell<sup>[32]</sup> 发现多株凯伦藻都具有很强的溶血毒性,  $10^3 \sim 10^5$  个藻细胞就可以导致超过 50% 的血细胞溶解,而本实验中  $3.2 \times 10^5$  个指数期塔玛亚历山大藻 (ATHK) 才能导致 50% 的血细胞溶解。因此塔玛亚历山大藻 (ATHK) 的溶血毒性低于凯伦藻的溶血毒性。

以前针对亚历山大藻的毒性影响和产毒生理学的研究中,多数研究者仅考虑其所产生的 PSP 毒素,而越来越多的研究证明,这类有毒赤潮藻除产生 PSP 毒素外,还能够产生其他一些水溶性或脂溶性的有毒物质,这些有毒物质对生物也产生显著的影响。因此在研究亚历山大藻对生物的危害以及对亚历山大藻进行毒素分离纯化时,不能仅仅局限于 PSP,还应考虑其他非 PSP 有毒物质,尤其是一些水溶性有毒物质如溶血性毒素、细胞性毒素等。

致谢:本实验得到了中国科学院海洋研究所陈晓琳博士和青岛市肿瘤医院杨升峰医师的大力协助,在此一并致以谢忱。

#### 参考文献:

- [1] Castonguay M, Levasseur M, Beaulieu J L, et al. Accumulation of PSP toxins in Atlantic mackerel: seasonal and ontogenetic variations [J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, 50: 1 203-1 213.
- [2] Hallegraeff G M. Harmful algal bloom: a global overview [A]. Hallegraeff G M, Anderson D M, Cembella A D. *Manual on Harmful Marine Microalgae* [C]. French: UNESCO's Workshops, 1995. 1-18.
- [3] Montoya N G, Akselman R, Franco J, et al. Paralytic shellfish toxins and Mackerel (*Scomber japonicus*) mortality in the Argentine sea [A]. *Harmful and Toxic Algal Blooms* [C]. Japan: the United Nations Educational, Scientific and Culture Organization, 1996. 417-410.
- [4] Robineau B, Gagne J A, Fortier L, et al. Potential impact of a toxic dinoflagellate (*Alexandrium excavatum*) bloom on survival of fish and crustacean larvae [J]. *Marine Biology*, 1991a, 108: 293-301.
- [5] Robineau B, Fortier L, Gagne J A, et al. Comparison of the response of five larval fish species to the toxic dinoflagellate *Alexandrium excavatum* (Braarud) Balech [J]. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 1991b, 152:225-242.
- [6] SU H M, Liao I C, Chiang Y M. Mass mortality of prawn caused by *Alexandrium* blooming in a culture pond in southern Taiwan [A]. Smayda T J. and Shimizu Y. *Toxic Phytoplankton Blooms in the sea* [C]. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B V, 1993. 329-333.
- [7] Garcia C, Bravo M C, Lagos M, et al. Paralytic shellfish poisoning: post mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the patagonia fjords [J]. *Toxicol*, 2004, 43:149-158.
- [8] Lagos N. Microalgal blooms: a global issue with nega-

- tive impact in Chile [J]. **Biology Research**, 1998, 31: 375-386.
- [9] Chen C Y, Chou H N. Ichthyotoxicity studies of milkfish *Chanos chanos* Fingerlings exposed to a harmful dinoflagellate *Alexandrium minutum* [J]. **Journal of Experimental Marine Biology Ecology**, 2001, 261:211-219.
- [10] Matthews S G, Grant C P. Worst recorded marine mortality on the south African coast [A]. Harmful and Toxic Algal Blooms [C]. Japan: the United Nations Educational, Scientific and Culture Organization, 1996. 89-92.
- [11] Teegarden G J. Copepod grazing selection and particle discrimination on the basis of PSP toxin content [J]. **Marine Ecology Progress Series**, 1999, 181: 163-176.
- [12] Ogata T, Kodama M. Ichthyotoxicity found in cultured media of *Protogonyaulax* spp. [J]. **Marine Biology**, 1986, 92(1): 31-34.
- [13] Emura A, Matsuyama Y, Oda T. Evidence for a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori* [J]. **Harmful Algae**, 2004, 3: 29-37.
- [14] Simonsen S, Møller B L, Larsen J, et al. Hemolytic activity of *Alexandrium tamarense* cells [A]. Harmful Marine Algal Blooms [C]. French: Lavoisier Publishing, 1995. 513-517.
- [15] 周名江, 颜天, 邹景忠. 长江口邻近海域赤潮发生区基本特征初探 [J]. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1 031-1 038.
- [16] 何家菀, 陈明惠, 何振荣. 小定鞭藻毒素的分离与鉴定 [J]. 水生生物学报, 1996, 20(1): 41-48.
- [17] Wang L P, Yan T, Yu R C, et al. Experimental study on the impact of dinoflagellate *Alexandrium* species on populations of the rotifer *Brachionus plicatilis* [J]. **Harmful Algae**, 2005, 4: 371-382.
- [18] Gribble K E, Keafer B A, Quilliam M A, et al. Distribution and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in the Gulf of Maine, USA [J]. **Deep Sea Research**, 2005, 52: 2 745-2 763.
- [19] Yan T, Zhou M J, Fu M, et al. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on early development of the Scallop *Argopectan irradians* concentricus [J]. **Aquaculture**, 2003, 217:167-178.
- [20] 尹伊伟, 王朝晖, 江天久, 等. 海洋赤潮毒素对鱼类的毒害 [J]. 海洋环境科学, 2000, 19(4): 62-65.
- [21] Arzul G, Seguel M, Guzman L, et al. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species [J]. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 1999, 232:285-295.
- [22] 龙华, 杜琦. 福建沿海米氏凯伦藻赤潮的初步研究 [J]. 福建水产, 2005, 4: 22-26.
- [23] Yamasaki Y, Kim Dae-Il, Matsuyama Y, et al. Production of superoxide anion and hydrogen peroxide by the red tide dinoflagellate *Karenia mikimotoi* [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2004, 97(3): 212-215.
- [24] Sataka M, Tanaka Y, Ishikura Y, et al. Gymnocin-B with the largest contiguous polytiguous polyether rings from the red tide dinoflagellate, *Karenia* (formerly *Gymnodinium*) *mikimotoi* [J]. **Tetrahedron Letters**, 2005, 46: 3 537-3 540.
- [25] Sataka M, Shoji M, Oshima Y, et al. Gymnocin-A, a cytotoxic polyether from the notorious red tide dinoflagellate, *Gymnodinium mikimotoi* [J]. **Tetrahedron Letters**, 2002, 43: 5 829-5 832.
- [26] 刘洁生, 彭喜春, 杨维东. 营养胁迫下球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa* Scherffel) 的生长行为及溶血活性 [J]. 生态学报, 2006, 26(3): 780-785.
- [27] 彭喜春, 杨维东, 刘洁生, 等. 实验室培养球形棕囊藻溶血毒素的提取、分离及其生成特征 [J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(1): 25-28.
- [28] 何家菀, 施之新, 张银华, 等. 一种棕囊藻的形态特征与毒素分析 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 172-179.
- [29] 陈洋. 有害赤潮对海洋浮游生态系统结构和功能影响的初步研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2005.
- [30] 刘洁生, 彭喜春, 杨维东. 营养胁迫下球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa* Scherffel) 的生长行为及溶血活性 [J]. 应用生态学报, 2006, 26(3): 780-785.
- [31] Peng X C, Yang W D, Liu J S, et al. Characterization of the hemolytic properties of an extract from *Phaeocystis globosa* Scherffel [J]. **Journal of Integrative Plant Biology Formerly Acta Botanica Sinica**, 2005, 47(2): 165-171.
- [32] Neely T, Campbell L. A modified assay to determine hemolytic toxin variability among *Karenia* clones isolated from the Gulf of Mexico [J]. **Harmful Algae**, 2006, 5: 592-598.

# The preliminary research on the hemolytic activity of the dinoflagellate *Alexandrium* spp.

TAN Zhi-jun<sup>1,2</sup>, YAN Tian<sup>1</sup>, YU Ren-cheng<sup>1</sup>, ZHOU Ming-jiang<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China)

**Received:** Jan. 15, 2007

**Key words:** *Alexandrium* spp.; human erythrocyte; hemolytic activity

**Abstract:** The hemolytic activity on human erythrocyte, of 11 strains of dinoflagellate *Alexandrium* spp. were studied in this paper. The results showed that seven *Alexandrium* species have hemolytic activity, which might be common characteristic for these *Alexandrium* species, although the hemolytic activity did not depend on their PSP-production ability. Furthermore, the hemolytic activity of *A. tamarense* (ATHK strain) was studied specially, and the result showed that this dinoflagellate had strong hemolytic activity, 4 pg digitonin/cell at the exponential phase. The hemolytic activity had relationship with growth phase and cell density of *A. tamarense*: the hemolytic activity in the culture medium gradually was highest and increased with increase during exponential growth phase, and relatively high activity was maintained even after reaching the death phase; algal cells, cell contents and cell fragment of *A. tamarense* all showed hemolytic activity and the hemolytic activity of cell fragment was highest relatively. While the PSP standards-STX toxins did not have hemolytic activity on human erythrocyte. All the results indicated that the hemolytic activity of *Alexandrium* spp. was not caused by PSP toxins, but other unknown toxins. Therefore, factors other than PSP toxins of *Alexandrium* spp. will also do harm to organism, through hemolytic activities or other toxins.

(本文编辑:张培新)