

强壮前沟藻(*Amphidinium carterae* Hulburt)毒素的 溶血活性研究*

葛蔚¹ 王金叶² 柴超^{3,4}

(1. 青岛农业大学生命科学学院 青岛 266109; 2. 青岛农业大学动物科技学院 青岛 266109;
3. 青岛农业大学资源与环境学院 青岛 266109; 4. 中国科学院海洋研究所
海洋生态与环境重点实验室 青岛 266071)

提要 以实验室单种培养的强壮前沟藻为对象,研究了强壮前沟藻毒素的来源,分析了藻毒素浓度与溶血活性的相关性,研究了理化因子对藻毒素溶血活性的影响。结果表明,溶血活性随着强壮前沟藻细胞的增殖呈上升的趋势,细胞内容物和细胞碎片的溶血活性显著高于去藻过滤液,强壮前沟藻毒素主要来源于衰亡期的细胞内容物和细胞碎片,并存在浓度相关的溶血性。强壮前沟藻毒素的溶血活性不存在光敏感性。随着 pH 的上升,毒素溶血活性呈降低趋势。 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 抑制了强壮前沟藻毒素溶血活性,而 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 显著的增强了溶血活性, Mg^{2+} 对其溶血活性的影响不显著。EDTA 对强壮前沟藻毒素的溶血活性有显著的促进作用。

关键词 强壮前沟藻,毒素,溶血活性

中图分类号 X55

随着近海富营养化问题的加剧,有毒有害藻形成的赤潮规模逐渐增大,频率逐渐增加,给水生生态系统和水产养殖带来极大的危害,其中甲藻产生的有毒次生代谢产物成为国内外学者的研究热点(颜天等, 2001; 周名江等, 2006; 彭喜春等, 2006; 贺华等, 2007; Smith *et al*, 1991; Riegman *et al*, 1992; Capriulo *et al*, 2002)。强壮前沟藻(*Amphidinium carterae* Hulburt)属甲藻类前沟藻属,主要分布于热带和温带海域,为世界性分布种。强壮前沟藻是一种能产生溶血性毒素的有害赤潮藻种,其特有的次生代谢产物一直备受关注。对于该藻的生长特性、环境条件对其生长的影响及其产毒等相关研究在国外已有报道(Nayak *et al*, 1997; 韩笑天等, 2004; Echigoya *et al*, 2005)。在我国,该藻分布的报道仅见南海和海南三亚海域,关于强壮前沟藻溶血毒素的研究尚未见报道。本研究以强壮前沟藻为研究对象,初步研究了强壮

前沟藻毒素的来源,分析了藻毒素浓度与溶血活性的相关性,研究了理化因子对藻毒素溶血活性的影响,从而为有害赤潮防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 培养条件

强壮前沟藻藻种由中国科学院海洋研究所提供,在室内(20 ± 1)、光照强度为 3500—3800 lx、光暗比为 12h/12h 的条件下,于 *f/2* 培养液中培养、观察。通过藻细胞计数法确定藻细胞密度,绘制生长曲线,确定生长时期。

1.2 各组分的制备及溶血毒素的提取

藻液经 4000r/min 离心 10min 后,上清液作为去藻过滤液,藻细胞沉淀用超声波破碎后,经 10000r/min 离心 10min,取上清液作为藻细胞内容物,沉淀作为藻细胞碎片。各组分的浓度都相当于 $4.35\times$

* 山东省自然科学基金项目, Q2007D06 号; 青岛农业大学高层次人才启动基金项目, 630642 号。葛蔚, 副教授, E-mail: gwi2050@126.com

通讯作者: 柴超, 博士, 副教授, E-mail: chaichao1999@126.com

收稿日期: 2008-10-21, 收修改稿日期: 2008-12-27

10^4 cells/ml。强壮前沟藻毒素的提取方法参照 Nayak 等(1997)的方法, 取各时期的去藻过滤液和藻细胞内容物, 用氯仿萃取 5 次, 收集氯仿, 旋转蒸发后收集浓缩物, 置于真空干燥器中干燥, 该浓缩物为强壮前沟藻粗毒素。

将藻细胞内容物中提取的毒素用含有 137mmol/L NaCl、2.7mmol/L KCl、8.1mmol/L Na_2HPO_4 和 1.5mmol/L KH_2PO_4 的磷酸缓冲液(PBS, pH = 7.2)稀释到原浓度的 1/4 和 1/16, 以获得不同的浓度梯度。

1.3 溶血活性测定

兔血经抗凝血处理, 经 2000r/min 离心 10min 将血浆分出, 用 PBS 缓冲液(pH=7.2)重复洗涤 3 次, 沉淀 PBS 缓冲液配成 5%的红细胞悬液, 4℃保存备用, 保存时间不超过 3 天, 以避免红细胞自溶。

溶血活性测定参照马兰萍等(2000)的方法并略作改进, 取 0.5ml 浓缩液与 1ml 5%兔红细胞悬液等体积混匀, 37℃培养 1.5h, 温育期间反应混合液轻轻摇动。温育完成后, 取出反应液 0.5ml 加入 4ml PBS 缓冲液, 2000r/min 离心 5min 将红细胞分离, 取上层清液在紫外可见分光光度计上 540nm 波长处测其吸光值 A; 同样取出反应液 0.5ml 加入 4ml 1%的 Triton X-100 使其完全溶血, 同样条件下离心后在 540nm 测吸光值 B, 百分溶血度等于 $(A/B) \times 100$ 。

1.4 理化条件对藻毒素溶血活性的影响测定

按照 1.2 的方法从衰亡期的藻细胞内容物中提取溶血毒素, 按照如下方法测定理化条件对藻毒素溶血活性的影响。

1.4.1 光照 将 0.5ml 毒素与 1ml 5%的兔红细胞悬液混合, 分别在有光和无光的条件下 37℃培养 1.5h 后, 离心, 测定吸光值, 计算百分溶血度。

1.4.2 pH 将 0.5ml 毒素分别与 1ml pH = 5、6、7.2、8 的 5%兔红细胞悬液混合, 37℃培养 1.5h 后, 离心, 测定吸光值, 计算百分溶血度。

1.4.3 二价金属离子 将 0.5ml 毒素与 1ml 5%的

兔红细胞悬液混合, 分别加入 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等的氯化物至终浓度为 0.05、0.5、5mmol/L, 37℃培养 1.5h 后, 离心, 测定吸光值, 计算百分溶血度。

1.4.4 EDTA 将 0.5ml 毒素与 1ml 5%的兔红细胞悬液混合, 分别加入 EDTA 至终浓度为 10、20、40mmol/L, 37℃培养 1.5h 后, 离心, 测定吸光值, 计算百分溶血度。

1.5 数据分析方法

实验重复 3 次。数据分析采用方差分析(ANOVA, LSD)对各实验与对照组均值之间的差异性进行显著性检验。结果表示为平均值 \pm 标准偏差。

2 结果

2.1 强壮前沟藻毒素的来源

表 1 结果表明, 每万个细胞的溶血百分数随着藻细胞的增殖呈上升的趋势, 对数期百分溶血度略低, 稳定期的百分溶血度升高, 衰亡期百分溶血度达到最高值, 显著高于对数期和稳定期($P < 0.01$)。对不同组分的溶血活性比较发现, 去藻过滤液的百分溶血度最低, 碎片的百分溶血度最高。在对数期和稳定期, 去藻过滤液的百分溶血度只有 1.29%和 1.97%, 衰亡期去藻过滤液的百分溶血度有所增加, 但也只有 7.81%, 去藻过滤液的百分溶血度与对照的差异不显著($P > 0.1$)。相比而言, 内容物和碎片呈现明显的溶血活性, 其百分溶血度显著高于去藻过滤液和对照($P < 0.001$)。在衰亡期, 内容物和碎片的百分溶血度均超过 70%。因此, 强壮前沟藻毒素主要来源于衰亡期的细胞内容物和细胞碎片。

2.2 藻毒素溶血活性的浓度相关性

从强壮前沟藻细胞内容物中提取毒素的溶血活性研究(表 2)发现, 百分溶血度与毒素的浓度之间相关系数为 0.792($P < 0.05$), 因此毒素存在浓度相关的溶血性, 随着稀释梯度的增加, 百分溶血度呈明显的降低趋势。当稀释梯度达到 1/16 时, 其百分溶血度低

表 1 强壮前沟藻不同生长时期各组分的溶血活性
Tab.1 The hemolytic activity of the toxin in the components of *A. carterae* in various phases

生长时期	百分溶血度(%)			
	对照	去藻过滤液	内容物	碎片
对数期	0.80 \pm 0.10	1.29 \pm 0.10	23.56 \pm 2.10	42.08 \pm 5.00
稳定期	0.70 \pm 0.10	1.97 \pm 0.40	42.15 \pm 0.02	51.78 \pm 1.70
衰亡期	0.70 \pm 0.10	7.81 \pm 0.20	70.13 \pm 2.50	78.22 \pm 11.60

表2 强壮前沟藻毒素不同浓度梯度下的溶血活性
Tab.2 The hemolytic activity of the toxin in *A. carterae* in various dilution gradients

稀释梯度	百分溶血度(%)		
	对数期	稳定期	衰亡期
1	23.56±2.10	42.15±0.02	70.13±2.50
1/4	1.18±0.27	34.51±0.45	2.20±0.01
1/16	1.12±0.06	1.71±0.05	2.30±0.49

于2%，与对照组没有明显差异。

2.3 理化条件对藻毒素溶血活性的影响

2.3.1 光照对溶血活性的影响 在有光条件下，百分溶血度为 88.83%±1.45%，在无光的条件下，百分溶血度为 88.97%±4.41%，二者没有显著性差异 ($P = 0.777$)，因此，强壮前沟藻毒素的溶血活性不存在光敏感性。

2.3.2 pH 对溶血活性的影响 不同 pH 对溶血活性的实验表明(表 3)，随着 pH 的上升，百分溶血度呈降低趋势。在 pH=5 和 6 时，百分溶血度最高，超过 96%，pH = 5 和 6 时的百分溶血度没有显著性差异 ($P = 0.624$)；当 pH = 7.2 和 8 时，百分溶血度降低显著 ($P < 0.05$)，低于 89%。

2.3.3 金属离子对溶血活性的影响 由表 4 可以

看出，金属离子对溶血活性的影响很大， Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 抑制了溶血活性，与对照组呈显著性差异，其中 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 对溶血活性的抑制程度较低，添加 5mmol/L 是百分溶血度分别降低了 5.8%和 8.0%，但 Cu^{2+} 抑制溶血活性的程度较大，5mmol/L 的 Cu^{2+} 使百分溶血度降低了 60.4%。 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 则相反，能显著的增强溶血活性，5mmol/L 的 Co^{2+} 和 Zn^{2+} 使百分溶血度分别上升了 7.0%和 10.8%。与 Ca^{2+} 相似， Mg^{2+} 也在一定程度上抑制了溶血活性，但差异不显著。

2.3.4 EDTA 对溶血活性的影响 表 5 表明，金属螯合剂 EDTA 对强壮前沟藻毒素的溶血活性有显著的促进作用，随着 EDTA 浓度的升高，溶血活性显著增加。

3 讨论

毒素的生物合成机制非常复杂，有害赤潮藻毒素的生物合成与藻细胞的生长环境及其生命周期存在密切的关系(Lehtimki *et al.*, 1994)。研究表明，亚历山大藻在对数生长期时开始分泌溶血毒素，但溶血活性很小，在生长稳定期和衰亡期溶血活性达到最大值(Emuraa *et al.*, 2004; 刘洁生等, 2006)。小定鞭藻和球形棕囊藻在对数生长期没有溶血毒素产生，但在进

表3 不同 pH 条件下强壮前沟藻毒素的溶血活性
Tab.3 The hemolytic activity of the toxin in *A. carterae* in various pH

pH	5	6	7.2	8
百分溶血度(%)	97.82±1.60	96.68±1.89	88.86±1.45*	85.99±0.94*

*表示 $P < 0.05$

表4 金属离子不同浓度下强壮前沟藻毒素的溶血活性
Tab.4 The hemolytic activity of the toxin in *A. carterae* in the presence of metal ions in different concentrations

离子	浓度(mmol/L)			
	0	0.05	0.5	5
Ca^{2+}	88.86±1.45	88.46±0.44	86.40±0.49	83.72±0.32*
Mg^{2+}	88.86±1.45	88.86±2.67	88.73±0.60	86.64±3.09
Mn^{2+}	88.86±1.45	84.24±0.41	83.18±0.29*	81.79±0.12*
Co^{2+}	88.86±1.45	86.34±1.97	88.88±0.66	95.08±0.78*
Zn^{2+}	88.86±1.45	87.84±0.51	95.11±0.95*	98.46±0.06*
Cu^{2+}	88.86±1.45	79.73±0.92*	66.19±1.83**	35.22±2.66**

*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

表5 EDTA 不同浓度下强壮前沟藻毒素的溶血活性
Tab.5 The hemolytic activity of the toxin in *A. carterae* in the presence of EDTA in different concentrations

EDTA 浓度(mmol/L)	0	10	20	40
百分溶血度(%)	88.86±1.45	93.41±1.73	97.46±0.26*	106.79±1.09**

*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

入稳定期时,分泌大量溶血素,并在衰亡期达到最高值(何家苑等,1996)。从实验中可以看出,与亚历山大藻相似,强壮前沟藻毒素的溶血活性在对数期活性较低,但在衰亡期达到高值。研究者认为植物在营养充足的条件下不会分泌有毒代谢物,只有在自身生存环境受到压迫时,为保证自身生存繁殖所需要的营养而激发的一种抑制其它竞争生物生长繁殖的功能,因而当细胞进入生长平稳期或衰亡期时,营养物质缺乏是导致细胞毒素生产能力增强的主要原因(Boyer *et al*, 1987; Boezar *et al*, 1988)。

不同来源的溶血毒素存在溶血程度的差异,表明毒素的溶血机理不同(Yasumoto *et al*, 1993)。据文献报道,微小卡罗藻在细胞破裂后向水中释放大量溶血毒素,且细胞内容物的溶血活性显著高于去藻过滤液(Deeds *et al*, 2002; 周成旭等, 2007a)。而微小亚历山大藻和赤潮异弯藻细胞外溶血度大于胞内溶血度,且胞外溶血度与种群密度存在相关性(Emuraa *et al*, 2004; 周成旭等, 2007b)。本研究结果表明,与微小卡罗藻相似,强壮前沟藻溶血毒素主要来源于细胞内容物和细胞碎片,说明该溶血物质主要是在细胞破裂时溶出,而不是在细胞生长代谢分泌到水中。研究表明,除细胞内容物外,一些产毒海洋微藻的细胞表面也存在一层多糖或蛋白结构物质,有可能是毒性物质的来源(颜天等, 2003)。Echigoya 等(2005)研究也表明,强壮前沟藻细胞中提取的多羟基多烯类化合物具有抗真菌和溶血活性,因此,强壮前沟藻毒素主要来源于细胞内和细胞表面。此外,强壮前沟藻毒素均有与浓度相关的溶血特征,随着毒素浓度的降低溶血活性降低,这与大多数的研究结论一致(周成旭等, 2007a, b)。

理化条件是影响毒素溶血活性的重要因素。研究者发现,环状异甲藻产生毒素的溶血活性与光照相关,在无光条件下没有溶血活性,而在有光条件下溶血活性可接近 100% (Sato *et al*, 2002)。本实验结果表明,强壮前沟藻毒素的溶血活性不存在光敏感性特征,在有光和无光条件下毒素的溶血活性没有显著差异。

H⁺浓度也是影响溶血毒素溶血活性的一个重要因素,不同来源和结构的溶血毒素在不同的 pH 下其活性是不同的(Malovrh *et al*, 1999; Tsai *et al*, 1997)。球形棕囊藻毒素的溶血活性在 pH 为 7 时最强(彭喜

春, 2005¹⁾); 小定鞭藻在 pH<5 时表现出溶血活性(何家苑等, 1996); 而鱼腥藻的溶血活性随 pH 升高而降低,在 pH 为 5 时最高(宋秀凯等, 2006),这与本研究的结果一致。这表明藻毒素的亲水端结构存在较大的差异。

金属离子对溶血素的作用有 2 个方面,即促进和抑制。关于二价金属离子对溶血活性影响的结论存在较大的差异。研究者发现无脊椎动物体内的蛋白类溶血毒素溶血作用的发挥需要 Ca²⁺的参与(Canicatti, 1990),宋秀凯等(2006)研究发现 Ca²⁺、Mg²⁺显著增加多变鱼腥藻的溶血活性,而添加 Ca²⁺、Mg²⁺等却抑制了集胞藻的溶血活性(赵媛媛等, 2007),其原因可能是这些溶血毒素是不同的蛋白质,其活性表达有的需要 Ca²⁺,有的不需要 Ca²⁺。此外,无脊椎动物体内的溶血素一般为热不稳定性、溶血作用需要 Ca²⁺的参与,但棘皮动物例外,其体液中的溶血因子为热稳定性,并不需要 Ca²⁺的参与(Canicatti, 1988)。溶血毒素的结构与性质导致 Ca²⁺在溶血活性中的作用有所不同。文献表明,强壮前沟藻溶血毒素是多羟基多烯类化合物,非蛋白质类物质,因此可能与上述藻毒素的溶血机理存在较大差异。在本研究中, Ca²⁺、Mg²⁺抑制了强壮前沟藻毒素的溶血活性。同时, Mn²⁺和 Cu²⁺也抑制了强壮前沟藻毒素的溶血活性,这与鱼腥藻和集胞藻溶血毒素的结论一致(宋秀凯等, 2006; 赵媛媛等, 2007)。某些金属离子对溶血作用的抑制有可能是通过封锁红细胞膜上孔洞,使得胞外水分子不能进入胞内,胞内渗透压的升高,从而阻止了红细胞膜的渗透破坏。但是, Co²⁺和 Zn²⁺却显著增加了强壮前沟藻毒素的溶血活性,在集胞藻的溶血活性实验中也发现 Zn²⁺有助于溶血活性的增强(赵媛媛等, 2007)。因此,不同二价阳离子对强壮前沟藻毒素溶血活性表达的影响存在较大的差异。而金属螯合剂 EDTA 对强壮前沟藻毒素的溶血活性有显著的促进作用。研究者发现,在球形棕囊藻毒素的溶血实验中, EDTA 可以也消除 Hg²⁺对溶血活性的抑制作用。其可能原因是 EDTA 与溶血素粗提液中残留的金属离子可以结合,从而解除了某些离子的抑制作用(彭喜春, 2005¹⁾)。

4 结论

强壮前沟藻细胞内容物和细胞碎片呈现明显的溶血活性,其百分溶血度显著高于去藻过滤液。在衰

1) 彭喜春, 2005. 球形棕囊藻溶血毒素及其生物合成机制的研究. 华南理工大学博士学位论文

亡期, 细胞内容物和细胞碎片的溶血活性高于其它时期。因此, 强壮前沟藻毒素主要来源于衰亡期的细胞内容物和细胞碎片。百分溶血度与毒素的浓度之间相关系数为 0.792, 强壮前沟藻毒素存在浓度相关的溶血性。

强壮前沟藻毒素的溶血活性不存在光敏感性, 有光和无光条件下溶血活性不存在显著性差异。随着 pH 的上升, 溶血活性呈降低趋势。在 pH=5 和 6 时, 百分溶血度最高。Ca²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺抑制了强壮前沟藻毒素的溶血活性; Co²⁺、Zn²⁺则相反, 能显著的增强溶血活性; Mg²⁺也在一定程度上抑制了溶血活性, 但与对照的差异不显著。金属螯合剂 EDTA 对强壮前沟藻毒素的溶血活性有显著的促进作用, 随着 EDTA 浓度的升高, 溶血活性显著增加。

参 考 文 献

- 马兰萍, 刘在群, 周波等, 2000. 绿茶多酚对自由基诱导的红细胞氧化性溶血的抑制作用. 科学通报, 45(12): 1271—1275
- 刘洁生, 彭喜春, 杨维东, 2006. 营养胁迫下球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa* Scherffel) 的生长行为及溶血活性. 生态学报, 3: 780—785
- 何家苑, 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
- 宋秀凯, 王蔚, 刘云章等, 2006. 理化因子对多变鱼腥藻溶血素活性的影响. 安全与环境学报, 6(6): 38—40
- 周成旭, 傅永静, 严小军, 2007a. 新型赤潮种类微小卡罗藻的溶血毒性检测. 海洋通报, 26(3): 112—116
- 周成旭, 傅永静, 严小军, 2007b. 4 种典型有害赤潮原因种的溶血特性研究. 生态毒理学报, 2(1): 78—82
- 周名江, 于仁成, 2006. 有害赤潮的形成机制、危害效应与防治对策. 自然杂志, 29(2): 72—77
- 赵媛媛, 王蔚, 刘云章等, 2007. 理化因子对集胞藻 PCC6803 溶血素溶血活性的影响. 环境科学研究, 20(4): 139—143
- 贺华, 王学魁, 孙之南等, 2007. 渤海裸甲藻和链状亚历山大藻的麻痹性贝毒毒素分析. 海洋通报, 26(5): 67—73
- 彭喜春, 刘洁生, 杨维东, 2006. 赤潮藻毒素生物合成研究进展. 热带亚热带植物学报, 14(1): 81—86
- 韩笑天, 颜天, 邹景忠等, 2004. 强壮前沟藻 (*Amphidinium carterae* Hulburt) 形态特征及其生长特性研究. 海洋与湖沼, 23(5): 279—283
- 颜天, 周名江, 2001. 加强赤潮毒性评价和灾害评估势在必行. 海洋科学, 25(4): 55—57
- 颜天, 周名江, 傅萌等, 2003. 赤潮异弯藻毒性及毒性来源的初步研究. 海洋与湖沼, 34(1): 50—55
- Boezar B A, Beitler M K, Liston J *et al*, 1988. Paralytic shellfish toxin in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture. Plant Physiology, 1285—1290
- Boyer G L, Sullivan J J, Andersen R J *et al*, 1987. Effects of nutrition limitation on toxin production and composition in marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. Marine Biology, 96: 123—128
- Canicatti C, 1988. The lytic system of *Holothuric polii* (Echinodermata): a review. Bollettino Di Zoologia, 55(3): 139—144
- Canicatti C, 1990. Hemolysins: pore forming proteins in invertebrates. Experientia, 46(3): 239—244
- Capriulo G M, Smith G Troy R *et al*, 2002. The planktonic food web structure of a temperate zone estuary, and its alteration due to eutrophication. Hydrobiologia, 475—476: 263—333
- Deeds J R, Terlizzi D E, Adolf J E *et al*, 2002. Toxic activity from cultures of *Karodinium micrum* (*Gyrodinium galatheanum*) (Dinophyceae) — a dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility. Harmful Algae, 1: 169—189
- Echigoya R, Rhodes L, Oshima Y, 2005. The structures of five new antifungal and hemolytic amphidinol analogs from *Amphidinium carterae* collected in New Zealand. Harmful Algae, 4: 383—389
- Emuraa A, Matsuyama Y, Oda T, 2004. Evidence for the production of a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori*. Harmful Algae, 3: 29—37
- Lehtimki J, Sivonen K, Luukkainen R *et al*, 1994. The effects of incubation time, temperature, light, salinity, and phosphorus on growth and hepatotoxin production by *Nodularia* strains. Archiv fur Hydrobiologie, 130: 269—282
- Malovrh P, Sepeie K, Turk T *et al*, 1999. Characterization of hemolytic activity of 3-alkylpyridinium polymers from the marine sponge *Reniera sarai*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 124: 221—226
- Nayak B B, Karunasagar K I, 1997. Influence of bacteria on growth and hemolysin production by the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. Marine Biology, 130: 35—39
- Riegman R, Noordeloos A M, Cadée G, 1992. Phaeocystis blooms and eutrophication of the continental coastal zones of the North Sea. Marine Biology, 112: 479—484
- Sato Y, Oda T, Muramatsu T *et al*, 2002. Photosensitizing hemolytic toxin in *Heterocapsa circularisquama*, a newly identified harmful red tide dinoflagellate. Aquatic Toxicology, 56: 191—196
- Smith W O, Jr Codispoti L A, Nelson D M *et al*, 1991. Importance of *Phaeocystis* blooms in the highlatitude ocean carbon cycle. Nature, 352: 514—516
- Tsai G J, Tsai F C, Kong Z L, 1997. Effects of temperature, medium composition, pH, salt and dissolved oxygen on hemolysin and cytotoxin production by *Aeromonas hydrophila* isolated from oyster. International Journal of Food Microbiology, 38: 111—116
- Yasumoto T, Murata M, 1993. Marine toxins. Chemical Review, 93: 1897—1909

HEMOLYTIC ACTIVITY OF TOXIN IN *AMPHIDINIUM CARTERAE* HULBURT

GE Wei¹, WANG Jin-Ye², CHAI Chao^{3,4}

(1. College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao, 266109; 2. College of Animal Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao, 266109; 3. Resource and Environmental College, Qingdao Agricultural University, Qingdao, 266109; 4. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Aggravating eutrophication in coastal zones resulted in larger and more frequent harmful algae with more toxic substances to local habitats. Toxic products of the secondary metabolism, such as dinoflagellates, are become a focus of research. Among them, *Amphidinium carterae* Hulburt is thought to be one of the toxin-producing species. For the first time in China, hemolytic toxin from *A. carterae* is carried out in this research. The dinoflagellate was cultured separately in laboratory; the source of toxin the relationship of toxin with hemolytic activity, and the effect of physical and chemical factors on the hemolytic activity were studied. The results show that the hemolytic activity increases with the proliferation of *A. carterae*. The hemolytic degree is low in exponential phase, intermediate in stationary phase, and high in decline phase (>70%). The hemolytic activity in cellular content and cell debris is significantly higher than that in the algae-free supernatant. Therefore, the toxin of *A. carterae* is mainly from cellular content and cell debris. Correlation study between the toxin and hemolytic activity shows that with increasing dilution gradient, the hemolytic activity decreases obviously. In the gradient at 1/16, the hemolytic degree is close to that of the control, and irrelevant to lighting as it reached almost 90% in both dark and light conditions. Therefore, no photosensitizing hemolytic activity existed. The hemolytic activity decreases with pH value: high at pH 5—6, and very low at pH 7.2—8. The result also shows that metal ions Ca²⁺, Mn²⁺ and Cu²⁺ inhibit the hemolytic activity by 5.8%—60%, while Co²⁺ and Zn²⁺ enhance it by 7.0% and 10.8% respectively, and Mg²⁺ shows no significant effect. In addition, EDTA can enhance the hemolytic activity significantly as an intercalating agent of metal.

Key words *Amphidinium carterae* Hulburt, Toxin, Hemolytic activity