

海洋微藻溶血毒素研究进展

江涛^{a*}, 滕德强^a, 江天久^a, 吕颂辉^a, 杨维东^b

(暨南大学, a. 赤潮与水环境研究中心; b. 生物系, 广州 510632)

摘要: 对海洋微藻溶血毒素的类型、理化性质、生物合成和毒性作用进行了综述, 分析了存在的问题和应用前景的展望。

关键词: 溶血毒素; 海洋微藻; 鱼毒性; 化感作用; 毒性效应

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.03.016

Advances in Hemolytic Toxins of Marine Microalgae

JIANG Tao^{a*}, TENG De-qiang^a, JIANG Tian-jiu^a, LÜ Song-hui^a, YANG Wei-dong^b

(a. Research Center for Harmful Algae and Aquatic Environment; b. Department of Biology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Hemolytic toxins are common toxic second-metabolites produced by fish-killing marine microalgae, partly responsible for the toxic mechanism of harmful algae such as allelopathy, anti-grazing and toxicity to marine mammals. The recent progresses in types, physical and chemical quality, biosynthesis and toxicity of hemolytic toxins were reviewed. The perspectives and problems in the studies of hemolytic toxins were also discussed.

Key words: Hemolytic toxins; Marine microalgae; Fish-killing; Allelopathic effects; Toxicity effects

溶血毒素(hemolytic toxins)是鱼毒性海洋微藻产生的一类次生代谢产物,是导致鱼类和贝类大量死亡的主要原因之一^[1-2]。溶血毒素的致毒作用与洋地黄皂甙(digitonin)相似,作用于红细胞而使之溶解破裂^[3-4]。该毒素对鱼类及水生动物的毒性作用靶器官为鳃,对生物膜的可逆作用引起生物膜通透和泄漏,从而导致鱼类死亡^[5]。能够产生溶血毒素且已经造成巨大渔业损失的鱼毒性赤潮藻主要有海洋卡盾藻(*Chattonella marina*)、球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)、米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)和多环旋沟藻(*Cochlodinium polykrikoides*)等^[6-8]。

由于鱼毒性藻类引发的赤潮在世界范围内造成了巨大的经济损失,其产生的溶血毒素逐渐成为海洋学研究的热点。据文献统计,约有30种以上藻类能够产生溶血毒素,主要隶属于甲藻门(Pyrrophyta)、针胞藻门(Rhaphidophyta)、定鞭藻门(Haptophyta)、蓝

藻门(Cyanophyta)和硅藻门(Bacillariophyta)^[7]。溶血毒素的种类繁多,结构和成分复杂,目前仅对少数藻类产生的溶血毒素研究得比较清楚且确定了化学结构,如小定鞭藻(*Prymnesium parvum*)、前沟藻(*Amphidinium* sp.)、卡尔藻(*Karlodinium* sp.)、环状异帽藻(*Heterocapsa circularisquama*)、米氏凯伦藻和球形棕囊藻等^[9-15]。本文对海洋微藻溶血毒素的类型、理化性质、生物合成和毒性作用进行综述,为今后深入研究海洋微藻溶血毒素和鱼毒性海洋微藻的毒性机制研究提供科学参考。

1 产生溶血毒素的藻类

细菌、水螅(Hydra)、水母(Jellyfish)、对虾(*Penaeus*)和藻类等均能分泌溶血毒素。细菌分泌的溶血毒素是其致病性的重要侵染因子,水螅等腔肠动物分泌的溶血毒素与摄食有密切关系,对虾等甲壳动物分泌的溶血毒素则是重要防护因子,而藻

收稿日期: 2011-08-16 接受日期: 2011-11-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(41106090); 广东省自然科学基金博士启动项目(S2011040003113); 广东省自然科学基金重点项目(8251063201000001); 国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室开放研究基金项目(200902); 中央高校基本科研业务费专项基金(21610103; 11610425)资助

作者简介: 江涛(1978~), 博士, 助理研究员, 主要研究方向为海洋环境化学

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jiangtaojnu@163.com

类分泌的溶血毒素是次生代谢产物,能对周围水体中的动植物产生毒害作用,可能是藻类的一种防御机制和生存策略^[16-17]。据文献统计,能够产生溶血毒素的藻类有 30 种,包括甲藻 16 种,针胞藻 5 种,定鞭藻 4 种,蓝藻 4 种,硅藻 1 种(表 1),每种藻都可能产生多种溶血毒素^[9,18]。

表 1 产生溶血毒素的藻类和毒素特征
Table 1 Characteristics of hemolytic toxins and toxin-producing marine algae species

	藻类 Algae species	毒素类型 Toxin type	参考文献 References
甲藻 Pyrrophyta	卡氏前沟藻 <i>Amphidinium carterae</i>	前沟藻毒素,大环内酯类 Amphidinolids, macrolides	[9]
	克氏前沟藻 <i>A. klebsii</i>		
	米氏凯伦藻 <i>Karenia mikmotoi</i>	醣脂类 Glycolipids	[19]
	剧毒卡尔藻 <i>Karlodinium veneficum</i> *	卡尔藻毒素 Karlotoxins	[15,20-21]
	<i>K. conicum</i>		
	环状异帽藻 <i>Heterocapsa circularisquama</i>	卟啉衍生物,具有光依赖性 Porphyrin derivative, light-dependent	[12,22]
	泰氏亚历山大藻 <i>Alexandrium taylori</i>	蛋白类,结构不详 Protein-like, unknown	[23]
	芬迪亚亚历山大藻 <i>A. fundyense</i>	结构不详 Unknown	[24]
	透明亚历山大藻 <i>A. lusitanicum</i>		
	奥氏亚历山大藻 <i>A. osterfeldii</i>		
	塔玛亚历山大藻 <i>A. tamarense</i>	结构不详 Unknown	[25]
	链状亚历山大藻 <i>A. catenella</i>		
	<i>Coolia monotis</i>	结构不详 Unknown	[26]
	多环旋沟藻 <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	结构不详 Unknown	[27]
	金氏环沟藻 <i>Gyrodinium aureolum</i>	结构不详 Unknown	[28]
	环节环沟藻 <i>G. instriatium</i>	结构不详 Unknown	[24]
针胞藻 Raphidophyta	海洋卡盾藻 <i>Chattonella marina</i>	至少 5 种成分,结构不详;光依赖性 Unknown, including at least five components, light-dependent	[29]
	卵圆卡盾藻 <i>C. ovata</i>	至少 4 种组分,结构不详 Unknown, including at least four components	[30]
	赤潮异弯藻 <i>Heterosigma akashiwo</i>	结构不详,光依赖性 Unknown, light-dependent	[1]
	<i>Fibrocapsa japonica</i>	不饱和脂肪酸 Polyunsaturated fatty acids	[11]
	<i>Olisthodiscus</i> sp.	结构不详,光依赖性 Unknown, light-dependent	[29]
定鞭藻 Haptophyta	<i>Chrysochromulina polylepis</i>	结构不详 Unknown	[28]
	小定鞭藻 <i>Prymnesium parvum</i>	小定鞭藻毒素 Prymnesins	[31]
	<i>P. nemamathecum</i>	结构不详 Unknown	[24]
	球形棕囊藻 <i>Phaeocystis globosa</i>	醣脂类 Glycolipids	[14]
蓝藻 Cyanophyta	聚球藻 <i>Synechococcus</i> sp.	蛋白类,结构不详 Protein-like, unknown	[32]
	集胞藻 <i>Synechocystis</i> sp.	结构不详 Unknown	[33]
	钙化裂须藻 <i>Schizothrix calcicola</i>	蛋白类,结构不详 Protein-like, unknown	[13]
	变异鱼腥藻 <i>Anabaena variabilis</i>	结构不详 Unknown	[34]
硅藻 Bacillariophyta	菱形藻 <i>Nitzschia</i> sp.	蛋白类,结构不详 Protein-like, unknown	[35]

* 先前定名为微小卡罗藻(*Karlodinium micrum*),后改为剧毒卡尔藻(*Karlodinium veneficum*)^[36]。
* Formerly named *Karlodinium micrum*, now named *Karlodinium veneficum*^[36].

2 藻类溶血毒素的类型、结构和性质

溶血毒素的种类繁多,结构和成分复杂。目前仅对少数藻类产生的溶血毒素研究得比较清楚且确定了化学结构(表1)。Kobayashi 等 1986 年从前沟藻(*Amphidinium* sp.)中分离出一类大环内酯类溶血毒素,命名为前沟藻毒素(*Amphidinolides*,图1)。迄今,从前沟藻(*Amphidinium* sp.)中报道了 38 种大环内酯类化合物,其中 34 种被称为 *Amphidinolides*^[9]。这些大环内酯类化合物可划分为 32 种分子骨架类型,化学结构和毒性特征存在较大差异,但其显著的抗肿瘤活性吸引了药物学家的关注。另外,成功确定溶血毒素化学结构的藻类还包括:小定鞭藻产生的 2 种小定鞭藻毒素(*Pymnesins*,图2)^[10]和一系列糖脂类化合物^[31];

Fibrocapsa japonica 产生的 3 种多不饱和脂肪酸^[11];环状异帽藻产生的 2 种卟啉衍生物^[12]和 4 种糖脂类溶血毒素^[22];球形棕囊藻产生的溶血毒素,包括 3 种糖脂类成分^[14];米氏凯伦藻产生的单半乳糖甘油二酯和双半乳糖甘油二酯也具有溶血活性^[19]。Place 等^[37]从剧毒卡尔藻(*Karlodinium micrum* = *Karlodinium veneficum*, 先前称为微小卡罗藻)中分离获得一类具有溶血毒性和细胞毒性的化合物,命名为卡尔藻毒素(*Karlotoxins*),有关的检测方法和毒素应用已于 2004 年获得美国专利,但其化学结构直到 2008 年才被报道^[15]。总的来讲,目前从藻类中分离并鉴定了化学结构的溶血毒素主要为糖脂类、双半乳糖、聚氧多烯聚醚、大环内酯类、卟啉衍生物和多不饱和脂肪酸等化合物。

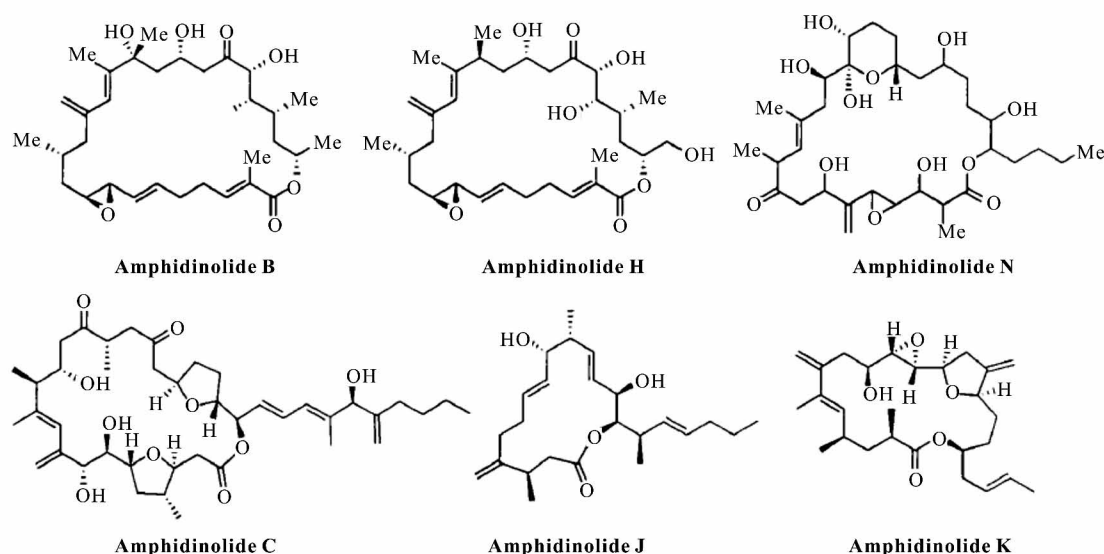


图1 *Amphidinolides* 的分子结构^[9]

Fig. 1 Structure of *amphidinolides*^[9]

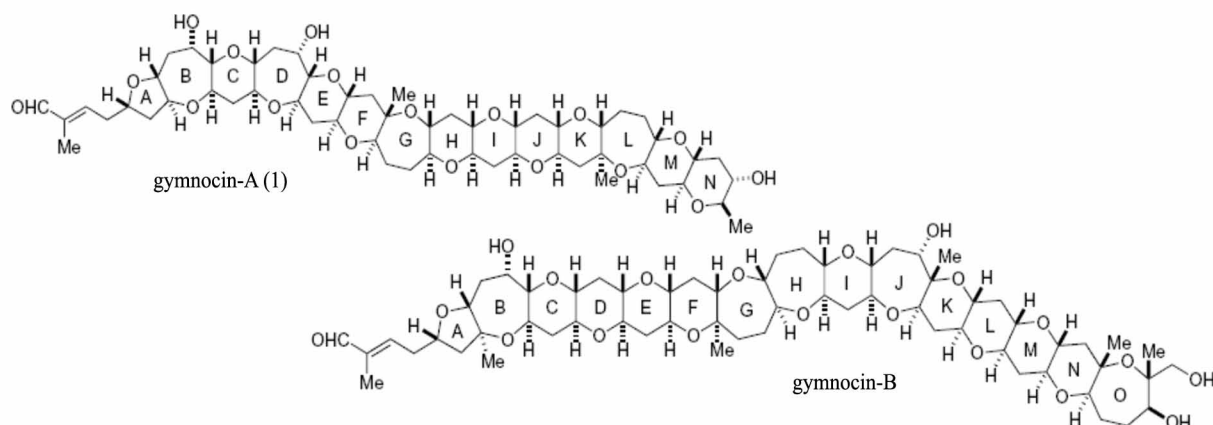


图2 *Pymnesins* 的分子结构^[19]

Fig. 2 Structure of *pymnesins*^[19]

对其他藻类溶血毒素的组成和理化性质也进行了大量研究。自我国东海海域的剧毒卡尔藻分离出的溶血毒素主要含有3种不同性质的组分,其中2种组分分离于总脂提取液,从而推测这2种组分与该藻高含量的多不饱和脂肪酸有关^[21,38]。集胞藻(*Synechocystis* sp.)含有蛋白类溶血毒素,分子量约为80 kDa,具有热不稳定性^[34]。与此相似,从泰氏亚历山大藻(*Alexandrium taylori*)中也分离出蛋白类溶血毒素^[23]。Onoue和Nozawa率先从海洋卡盾藻中分离出溶血毒素,并测定出其对绵羊红细胞的溶血活性为0.18 HU mg⁻¹^[39]。海洋卡盾藻溶血毒素包括多种组分,可能为糖脂和糖类物质,某些组分的溶血活性具有光依赖性,只有在光照条件下才有活性,兔红细胞对该溶血毒素最为敏感^[29,40-41]。

3 藻类溶血毒素的检测方法

溶血毒素的检测主要是红细胞溶解测定法(Erythrocyte Lysis Assay, ELA),其原理是基于溶血毒素作用于红细胞使之溶解破裂,从而通过吸光度的变化来判断溶血毒素是否存在,并与已知浓度的溶血性物质(如洋地黄皂甙)进行比对以确定其溶血能力^[1-2,4]。研究表明,温度、pH、金属阳离子、氧化物及某些蛋白类物质等能对藻类溶血毒素的溶血活性产生影响^[1,3,42-43]。例如,米氏凯伦藻和球形棕囊藻溶血毒素的溶血活性随温度的升高而增加^[3,44];半胱氨酸盐、过氧化氢和Zn²⁺等都能提高集胞藻的溶血活性,某些还原剂和金属离子(Ca²⁺、Mg²⁺和Cu²⁺等)则抑制其溶血活性^[43]。Ca²⁺能够显著增强海葵(*Stichodactyla helianthus*)溶血毒素的溶血活性,而在K⁺同时存在时这种增强效果骤减^[42];Hg²⁺对米氏凯伦藻和球形棕囊藻溶血毒素的活性具有很强的抑制作用^[3,44]。溶血毒素对不同类型红细胞的溶血活性也存在差异,如海洋卡盾藻溶血毒素对兔红细胞的溶解程度明显高于其他动物^[41]。由此可以看出,影响溶血毒素活性的因素很多,且没有普遍的规律性。另外,在不同检测波长下所测得的溶血毒素活性也不尽相同^[1,24,42]。红细胞溶解测定法是目前溶血毒素测定最常用的方法,但与其他多数生物检测方法相似,该法仅能够实现溶血毒素的初步定性定量分析,精确度不高,也无法获得具体的化合物信息。ELA法测定溶血毒素的影响因素较多,重现性较

差,不同实验室之间缺乏统一的标准和程序,测定结果缺乏可比性。

建立化学仪器检测方法是实现溶血毒素准确性定量的关键。目前国际上只有少数实验室分离纯化了藻类溶血毒素并建立了仪器检测方法,如Place等^[37]建立了Karlotoxins的HPLC-MS检测法,实现了对该毒素的定性定量分析。在此基础上,Mooney等^[20,45]对不同产地和株系的卡尔藻和其他海洋微藻的Karlotoxins含量和特征进行了研究。由于多数海洋微藻溶血毒素的化学结构尚未确定以及毒素纯品(标准品)缺乏,相关的仪器检测方法不够完善,制约了海洋藻类溶血毒素的深入研究。

4 影响海洋微藻溶血毒素合成的因素

海洋微藻溶血毒素的产生机制非常复杂,与其生命周期密切相关。不同产毒藻在不同生长阶段的毒素产量可能存在较大差别,如塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)和链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)在对数生长初期和中期麻痹性贝类毒素(PSP)含量最高,随后显著下降,新陈代谢可能是其含量下降的主要原因^[46];而球形棕囊藻和利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*)分别产生的溶血毒素和大田软海绵酸(OA)浓度峰值却出现在平台期或衰亡期,表明这两种藻的产毒机制与*Alexandrium* sp.不同^[4]。Yasumoto^[10]认为,藻类毒素的产生可能与自我保护机制有关,随着水体中营养元素不断被消耗,产毒藻在平台期或衰亡期合成能抑制其他竞争生物生长繁殖的次生代谢产物,从而在竞争中处于优势地位。但是,周成旭等^[38]对不同生长期剧毒卡尔藻溶血活性的研究表明,该藻在整个生长期都有较高的溶血活性,从而推测溶血毒素是该藻正常的生理代谢产物,并非受到环境胁迫后才合成的次生代谢产物。江涛等^[47]对海洋卡盾藻的溶血活性进行了研究,结果表明海洋卡盾藻在对数生长初期的溶血活性最强,溶血活性随培养时间的延长逐渐下降,推测可能是藻细胞毒素的合成速率与细胞的分裂速率不同步有关。

环境因素影响溶血毒素的合成。溶血毒素的合成与藻类的生长环境密切相关,当藻类生长受到限制时,溶血毒素的分泌量可能会增大^[4,48-53],但不同限制因素对不同藻类溶血毒素合成的影响并不一致。研究表明,温度对球形棕囊藻溶血毒素合成

的影响较为显著,而盐度和光照对其影响则不显著^[50],但盐度能够显著影响海洋卡盾藻和 *Fibrocapsa japonica* 的溶血活性^[51-52];水体中高 pH 和低 pH 均能增强剧毒卡尔藻的溶血活性,而小定鞭藻对鱼的溶血毒性随水体 pH 降低而减小^[49,53]。水体中营养元素限制也可能促进溶血毒素合成,如 N 和 P 限制都能够增强 *Chrysochromulina polylepis* 和小定鞭藻的溶血活性^[48],Fe 和 N 限制对球形棕囊藻溶血活性的影响非常显著^[4];与此相反, *Fibrocapsa japonica* 的溶血活性在 N 限制下要比非 N 限制小,其原因可能是由于非 N 限制下该藻易于聚集从而能够积累溶血毒素^[46]。营养元素限制对其他类型藻毒素的合成也存在影响,如 P 限制下塔玛亚历山大藻麻痹性贝类毒素产量增加,N 和 P 限制下利玛原甲藻和渐尖鳍藻(*Dinophysis acuminata*)细胞中大田软海绵酸含量增加^[54]。值得注意的是,营养元素影响藻毒素合成的化学机理仍不清楚。

5 溶血毒素对水生生物的毒性(化感作用)

赤潮藻溶血毒素的产生可能是抑制其它藻类竞争者生长和繁殖的策略(化感作用)^[16-17]。当藻类生存环境受到压迫时,为保证自身生存繁殖的需要而产生一种抑制其它竞争生物生长繁殖的物质,即化感物质。溶血毒素可能是鱼毒性赤潮藻产生的一类重要的化感物质^[4,16-17,28]。塔玛亚历山大藻滤液对东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)的生长具有显著的抑制作用,抑制效果与溶血活性的强弱程度一致,而与麻痹性贝类毒素(PSP)的浓度无关,说明溶血毒素可能在塔玛亚历山大藻化感效应中发挥重要作用^[55]。研究表明,小定鞭藻在 N 或 P 缺乏条件下,其滤液对威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)、微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)和波罗的海红胞藻(*Rhodomonas cf. baltica*)的生长均产生抑制作用^[56]。但是,在营养充足时,小定鞭藻滤液对这些藻不产生抑制作用。营养盐限制刺激了小定鞭藻毒素(Prymnesins)产量增加,这可能是小定鞭藻滤液能够抑制其他藻类生长的主要原因^[56]。另外,许多能够产生溶血毒素的赤潮藻,如 *Chrysochromulina polylepis* 和 *Karenia mikimotoi* 等,均显示出对其他藻类生长的抑制作用,但相关的化感物质尚不能确定^[28]。

溶血毒素对鱼类等水生动物具有明显的毒害作用^[49]。溶血毒素作用的部位为鱼类的鳃弓、鳃耙、鳃丝及鳃小片,中毒鱼鳃出现鳃小叶上皮细胞增生、邻近鳃小叶粘连、上皮细胞脱落、鳃血管破裂、血细胞渗出等组织病理现象。鳃小叶在溶血毒素作用下发生病变,影响鱼鳃的呼吸、分泌和排泄等功能,最终造成鱼类的死亡^[57-59]。溶血毒素可能是通过改变膜的透性而导致水生动物中毒,其被水生动物吸收后产生直接的致毒效应,或者在阳离子(Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 等)存在和适宜的 pH 条件下对鳃组织造成损伤。小定鞭藻产生的溶血毒素在加入毒素抑制剂(如卵磷脂、胆固醇及脑磷脂等)后,溶血活性显著降低,说明该类溶血毒素和胆固醇等物质竞争相同的靶位^[60]。另外,溶血毒素可能还具有多重危害性,如小定鞭藻(*P. parvum*)所分泌的毒素除了能溶解血红细胞外,还可以对肝细胞、羊膜细胞、腹水细胞以及肿瘤细胞的细胞膜产生作用而使之溶解,因此被认为具有细胞毒性^[61]。

6 溶血毒素的应用前景

溶血毒素在医药卫生领域具有重要的应用价值。从 *Amphidinium* sp. 中分离的大环内酯类溶血毒素(Amphidinolides)以其独特的大环内酯结构和显著的抗肿瘤活性,吸引了众多药物学家和化学家关注。研究表明,Amphidinolides 对小鼠淋巴瘤 L1210 细胞和人类表皮样癌 KB 细胞表现出很好的细胞毒性(在 $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ 下有 70%~90% 的抑制率)^[9]。有些赤潮藻,如 *Heterocapsa circularisquama*, *Chattonella marina* 和 *Heterosigma akashiwo* 等,产生的溶血毒素具有光依赖性,只有在光照下才具有溶血活性,所以这类溶血毒素可以应用于光敏剂药物的研发^[1,12,29]。目前,光敏剂药物已经广泛应用于治疗恶性肿瘤。另外,溶血毒素在抗真菌和病毒方面也有一定的效果^[37,62]。总的来讲,溶血毒素种类繁多,结构差异大,生物活性各异,具有很大的药物开发潜力。

另外,溶血毒素在海洋环境监测和食品安全领域具有重要的作用。目前,有关海洋微藻溶血毒素对人类健康的影响尚不明确。明确溶血毒素产毒藻种和毒素特征,分离纯化足量溶血毒素纯品并建立精确的定性定量检测方法,实现对鱼毒性赤潮和水产品中溶血毒素的监测,这对保护海洋生态环境安全和人类健康具有重要意义。

7 溶血毒素研究中存在的问题

溶血毒素是赤潮藻类分泌的有害毒素之一,但目前人们对其结构和毒性机理的研究还不够深入。当前,鱼毒性赤潮在全球范围内爆发频率不断增加,给养殖业带来很大的损失,甚至导致生态系统的崩溃,已经成为世界各国海水养殖产业的主要威胁之一。但溶血毒素种类很多,不同鱼毒性赤潮藻所产生的溶血毒素结构和性质差异大,溶血毒素含量低,难以获得毒素纯品,尤其是缺少精确的定性定量检测方法,无法有效地对鱼毒性赤潮的毒性进行监测。多数藻类产生的溶血毒素结构未知,无法确定其对水生生物的毒力、毒性和致毒机理,其在食物链中的传递及其对人类健康的危害也不明确。

不同生长阶段下鱼毒性藻类溶血活性存在差异,水体中的某些物理化学因素能够影响溶血毒素的合成,这将为鱼毒性海洋微藻的毒性监控提供理论依据。但从已发表的资料来看,有关海洋藻类溶血毒素的检测主要局限于溶血活性分析,而溶血活性无法有效地反映溶血毒素的组成和含量,难以揭示溶血毒素合成与环境因素的关系;溶血毒素的溶血活性和鱼毒性(溶血毒素对鱼类等水生动物的毒性)之间没有必然的相关性,因此根据溶血活性值难以揭示产毒藻对水生动物的毒性^[18,63]。

从我国海域溶血毒素产毒藻藻华的发生史来看,该类藻华在不同地区或季节爆发时毒性差异很大,如1993和1995年在北黄海近岸、2003和2004年在大亚湾爆发的海洋卡盾藻藻华分别造成大量蛤蜊(*Macra chinensis*)和鱼类死亡,而2005年10月和2008年8月分别发生在大亚湾和大连近岸海域的该藻藻华并没有造成明显的鱼类和贝类死亡^[64-65]。与此相似,1997年秋至1998年春粤东海域爆发的球形棕囊藻藻华对当地水产养殖业造成很大的经济损失,但2005年春湛江港再次爆发大规模球形棕囊藻藻华,仅造成少量鱼类死亡^[7,66]。溶血毒素在藻类毒性作用中起多大的作用?藻类溶血毒素合成受到环境因素的控制程度如何?不同藻株和环境条件下,藻类溶血毒素的化学组成和毒性如何?有关海洋微藻溶血毒素组成、化学结构、合成机制和毒性毒理等方面的研究尚有待于深入研究。

参考文献

- [1] Ling C, Trick C G. Expression and standardized measurement of hemolytic activity in *Heterosigma akashiwo* [J]. Harm Alg, 2010, 9(5): 522-529.
- [2] Neely T, Campbell L. A modified assay to determine hemolytic toxin variability among *Karenia* clones isolated from the Gulf of Mexico [J]. Harm Alg, 2006, 5(5): 592-598.
- [3] Peng X C, Yang W D, Liu J S, et al. Characterization of the hemolytic properties of an extract from *Phaeocystis globosa* Scherffel [J]. J Integrat Plant Biol, 2005, 47(2): 165-171.
- [4] Liu J S(刘洁生), Peng X C(彭喜春), Yang W D(杨维东). Growth and hemolytic activities of *Phaeocystis globosa* Scherffel at different nutrients condition [J]. Acta Ecol Sin(生态学报), 2006, 26(3): 780-785.(in Chinese)
- [5] Ulitzer S, Shilo M. Mode of action of *Prymnesium parvum* ichthyotoxin [J]. J Eukaryot Microbiol, 1966, 13(2): 332-336.
- [6] Hiroishi S, Okada H, Imai I, et al. High toxicity of the novel bloom-forming species *Chattonella ovata* (Raphidophyceae) to cultured fish [J]. Harm Alg, 2005, 4(4): 783-787.
- [7] Qi Y Z(齐雨藻). Studies on the Red Tides of South China Sea [M]. Guangzhou: Guangdong Economic Publish House, 2008: 1-280. (in Chinese)
- [8] Lee D K. *Cochlodinium polykrikoides* blooms and eco-physical conditions in the South Sea of Korea [J]. Harm Alg, 2008, 7(3): 318-323.
- [9] Kobayashi J, Kubota T. Bioactive macrolides and polyketides from marine dinoflagellates of the genus *Amphidinium* [J]. J Nat Prod, 2007, 70(3): 451-460.
- [10] Yasumoto T. The chemistry and biological function of natural marine toxins [J]. Chem Rec, 2001, 1(3): 228-242.
- [11] Fu M, Koulman A, van Rijssel M, et al. Chemical characterization of three haemolytic compounds from the microalgal species *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) [J]. Toxicon, 2004, 43(4): 355-363.
- [12] Miyazaki Y, Nakashima T, Iwashita T, et al. Purification and characterization of photosensitizing hemolytic toxin from harmful red tide phytoplankton, *Heterocapsa circularisquama* [J]. Aquat Toxicol, 2005, 73(4): 382-393.
- [13] Harrigan G G, Yoshida W Y, Moore R E, et al. Isolation, structure determination, and biological activity of dolastatin 12 and lyngbyastatin 1 from *Lyngbya majuscula*/Schizothrix calcicola cyanobacterial assemblages [J]. J Nat Prod, 1998, 61(10): 1221-1225.
- [14] He J W(何家苑), Shi Z X(施之新), Zhang Y H(张银华), et al. Morphological characteristics and toxins of *Phaeocystis* cf. *pouchetii* (Prymnesiophyceae) [J]. Oceanol Limnol Sin(海洋与湖泊), 1999, 30(2): 172-179.(in Chinese)
- [15] Mooney B D, de Salas M F, Hallegraeff G M, et al. Karlotoxin production by two species of *Kalodinium* (Dinophyta): Algicidal activity against *Karenia* and ichthyotoxicity against *Sheepshead minnow* larvae [C]// Ho K C, Zhou M J, Qi Y Z. Proceedings of 13th International Conference on Harmful Algae. Hong Kong: International Society for the Study of

- Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2008: 137–141.
- [16] Kubanek J, Hicks M K. Does the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* use allelopathy to outcompete other phytoplankton? [J]. *Limnol Oceanogr*, 2005, 50(3): 883–895.
- [17] Granéli E, Hansen P J. Allelopathy in harmful algae: A mechanism to compete for resources? [C]// Granéli E, Turner J T. *Ecology of Harmful Algae*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006: 189–201.
- [18] Schug K A, Skinge T R, Spencer S E, et al. Hemolysis, fish mortality, and LC-ESI-MS of cultured crude and fractionated golden alga (*Prymnesium parvum*) [J]. *J Amer Water Resour Assoc*, 2010, 46(1): 33–44.
- [19] Parrish C C, Bodenne G, Gentien P. Haemolytic glycolipids from *Gymnodinium* species [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(5): 783–787.
- [20] Mooney B D, Hallegraeff G M, Place A R. Ichthyotoxicity of four species of gymnodinioid dinoflagellates (Kariaceae, Dinophyta) and purified karlotoxins to larval *Sheepshead minnow* [J]. *Harm Alg*, 2010, 9(6): 557–562.
- [21] Zhou C X, Fernández N, Chen H M, et al. Toxicological studies of *Karlodinium micrum* (Dinophyceae) isolated from East China Sea [J]. *Toxicon*, 2011, 57(1): 9–18.
- [22] Hiraga Y, Shikano T, Widiarti T, et al. Three new glycolipids with cytolytic activity from cultured marine dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* [J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(8): 649–657.
- [23] Emura A, Matsuyama Y, Oda T. Evidence for the production of a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori* [J]. *Harm Alg*, 2004, 3(1): 29–37.
- [24] Eschbach E, Scharack J P, John U, et al. Improved erythrocyte lysis assay in microtitre plates for sensitive detection and efficient measurement of haemolytic compounds from ichthyotoxic algae [J]. *J Appl Toxicol*, 2001, 21(6): 513–519.
- [25] Tan Z J (谭志军), Yan T (颜天), Yu R C (于仁成), et al. The preliminary research on the hemolytic activity of the dinoflagellate *Alexandrium* spp. [J]. *Mar Sci (海洋科学)*, 2008, 32(12): 75–81. (in Chinese)
- [26] Liu N N (刘宁宁), Lin Y S (林永水). Studies on toxic dinoflagellate, *Coolia monotis* Meunier: I. Thecal Morphology [J]. *Trop Oceanol (热带海洋)*, 1999, 18(2): 1–6. (in Chinese)
- [27] Dorantes-Aranda J J, García-de la Parra L M, Alonso-Rodríguez R, et al. Hemolytic activity and fatty acids composition in the ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* isolated from Bahía de La Paz, Gulf of California [J]. *Mar Pollut Bull*, 2009, 58(9): 1401–1405.
- [28] Yasumoto T, Underdal B, Aune T, et al. Screening for hemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polylepis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters [C]// Granéli E, Sundström B, Edler L. *Toxic Marine Phytoplankton*. Amsterdam: Elsevier, 1990: 436–440.
- [29] Kuroda A, Nakashima T, Yamaguchi K, et al. Isolation and characterization of light-dependent hemolytic cytotoxin from harmful red tide phytoplankton *Chattonella marina* [J]. *Comp Biochem Physiol Pt C*, 2005, 141(3): 297–305.
- [30] Zhong Y (钟艳). Toxin-production characters and toxic effect of *Chattonella ovate* on *Artemia salina* [D]. Guangzhou: South China Normal University, 2008: 11–20. (in Chinese)
- [31] Henrikson J C, Gharfeh M S, Easton A C, et al. Reassessing the ichthyotoxin profile of cultured *Prymnesium parvum* (golden algae) and comparing it to samples collected from recent freshwater bloom and fish kill events in North America [J]. *Toxicon*, 2010, 55(7): 1396–1404.
- [32] Sakiyama T, Ueno H, Homma H, et al. Purification and characterization of a hemolysin-like protein, Sll1951, a nontoxic member of the RTX protein family from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 [J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(10): 3535–3542.
- [33] Liu Y Z, Wang W, Ru S G, et al. Evidence for the production of a proteinaceous hemolytic exotoxin by wild-type strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Cyanobacteria) [J]. *J Appl Phycol*, 2008, 20(1): 89–95.
- [34] Wang W, Song X K, Ru S G. Studies on the factors affecting the growth and hemolytic activity of *Anabaena variabilis* [J]. *J Appl Phycol*, 2007, 19(4): 365–371.
- [35] Rangel M, Malpezzi E L A, Susini S M M, et al. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia* [J]. *Toxicon*, 1997, 35(2): 305–309.
- [36] Wang H X (王红霞), Lu D D (陆斗定), Huang H Y (黄海燕), et al. Morphological and phylogenetic analysis of *Karlodinium veneficum* isolated from the east China Sea in China [J]. *Chin Bull Bot (植物学报)*, 2011, 46(2): 179–188. (in Chinese)
- [37] Place A, Deeds J R. Dinoflagellate karlotoxins, methods of isolation and uses thereof: US, 100659 [P]. 2004.
- [38] Zhou C X (周成旭), Fu Y J (傅永静), Chen Q F (陈清峰), et al. Hemolytic activity of *Karlodinium micrum* at different growth phases and analysis of hemolysin species [J]. *Acta Ocean Sin (海洋学报)*, 2009, 31(2): 146–152. (in Chinese)
- [39] Onoue Y, Nozawa K. Separation of toxins from harmful red tides occurring along the coast of Kagoshima Prefecture [M]// Okaichi T, Anderson D M, Nemoto T. *Red Tides, Biology, Environmental Science, and Toxicology*. New York: Elsevier Science, 1989: 371–374.
- [40] Zhang W (张文), Jiang T J (江天久), Wang R (王锐). The extraction and separation of hemolytic toxin from *Chattonella marina* Hong Kong strain [J]. *Ecol Sci (生态科学)*, 2008, 27(6): 457–462. (in Chinese)
- [41] Peng Y H (彭颖慧), Liu J S (刘洁生), Li H Y (李宏业), et al. Studies on performance standard for hemolytic toxins in harmful bloom algae [J]. *J Hyg Res (卫生研究)*, 2009, 38(6): 653–656. (in Chinese)
- [42] Celedón G, González G, Lissi E, et al. Effect of calcium on the

- hemolytic activity of *Stichodactyla helianthus* toxin sticholysin II on human erythrocytes [J]. *Toxicon*, 2009, 54(6): 845–850.
- [43] Zhao Y Y(赵媛媛), Wang W(王蔚), Liu Y Z(刘云章), et al. Effects of physical and chemical agents on the hemolytic activity of hemolysin produced by *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Res Environ Sci(环境科学研究)*, 2007, 20(4): 139–143. (in Chinese)
- [44] Cui W M(崔伟民), Yang W D(杨维东), Liu J S(刘洁生), et al. Hemolytic properties of hemolytic extracts from *Karenia mikimotoi* Hasen [J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, 2009, 17(3): 237–241. (in Chinese)
- [45] Mooney B D, de Salas M F, Hallegraeff G M, et al. Survey for karlotoxin production in 15 species of gymnodinioid dinoflagellates (Kareniaceae, Dinophyta) [J]. *J Phycol*, 2009, 45(1): 164–175.
- [46] Boczar B A, Beitler M K, Liston J, et al. Paralytic shellfish toxin in *Protogonyaulax tamarens* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture [J]. *Plant Physiol*, 1988, 88(4): 1285–1290.
- [47] Jiang T(江涛), Wang R(王锐), Wu N(吴霓), et al. Study on hemolytic activity of *Chattonella marina* Hong Kong Strain [J]. *Environ Sci(环境科学)*, 2011, 32(10): 2920–2925. (in Chinese)
- [48] Johansson N, Granéli E. Cell density, chemical composition and toxicity of *Chrysochromulina polylepis* (Haptophyta) in relation to different N : P supply ratios [J]. *Mar Biol*, 1999, 135(2): 209–217.
- [49] Valenti T W Jr, James S V, Lahousse M J, et al. A mechanistic explanation for pH-dependent ambient aquatic toxicity of *Prymnesium parvum* Carter [J]. *Toxicon*, 2010, 55(5): 990–998.
- [50] Guo J(郭瑾), Yang W D(杨维东), Liu J S(刘洁生), et al. Effects of salinity, temperature and light intensity on the growth and toxin production of *Phaeocystis globosa* [J]. *Acta Sci Circumst(环境科学学报)*, 2007, 27(8): 1341–1346. (in Chinese)
- [51] Huang J(黄娟), Yang W D(杨维东), Liu J S(刘洁生), et al. Effects of temperature, salinity, and light intensity on the growth and toxin production of *Chattonella marina* [J]. *Chin J Appl Ecol(应用生态学报)*, 2009, 20(5): 1190–1195. (in Chinese)
- [52] de Boer M K, Tyl M R, Vrieling E G, et al. Effects of salinity and nutrient conditions on growth and haemolytic activity of *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) [J]. *Aquat Microb*, 2004, 37(2): 171–181.
- [53] Fu Y J(傅永静), Zhou C X(周成旭), Yan X J(严小军). Effects of environmental stress on hemolysin secretion of *Karlodinium micrum* [J]. *J Ningbo Univ (Nat Sci Eng)(宁波大学学报: 理工版)*, 2009, 22(2): 175–180. (in Chinese)
- [54] Wang D Z, Hsieh D P H. Effects of nitrate and phosphate on growth and C2 toxin productivity of *Alexandrium tamarense* C101 in culture [J]. *Mar Pollut Bull*, 2002, 45(2): 286–289.
- [55] Liu J S(刘洁生), Xie J(谢瑾), Yang W D(杨维东). Studies on haemolytic toxins action in allelopathy of *Alexandrium tamarense* [J]. *J Jinan Univ (Nat Sci Med)(暨南大学学报: 自然科学版与医学版)*, 2007, 28(1): 105–107. (in Chinese)
- [56] Granéli E, Johansson N. Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions [J]. *Harm Alg*, 2003, 2(2): 135–145.
- [57] Wang Z H(王朝晖), Yin Y W(尹伊伟), Qi Y Z(齐雨藻), et al. Histopathological changes in fish gills during *Gymnodinium mikimotoi* red tide in Guishan Island area, the South China Sea [J]. *Acta Ocean Sin(海洋学报)*, 2001, 23(1): 133–139. (in Chinese)
- [58] Ou X Y(欧祥亚). Histopathological effect of *Karenia mikimotoi* bloom on gills of common farmed fishes in the East China Sea [D]. Guangzhou: Jinan University, 2006: 15–34. (in Chinese)
- [59] Yang Z B, Hodgkiss I J. Hong Kong's worst “red tide”: Causative factors reflected in a phytoplankton study at Port Shelter station in 1998 [J]. *Harm Alg*, 2004, 3(2): 149–161.
- [60] Rowe G E, Welch R A. Assays of hemolytic toxins [J]. *Meth Enzymol*, 1994, 235(1): 657–667.
- [61] Tsukanoa C, Sasaki M. Structure-activity relationship studies of gymnocin-A [J]. *Tetrahed Lett*, 2006, 47(38): 6803–6807.
- [62] Echigoya R, Rhodes L, Oshima Y, et al. The structures of five new antifungal and hemolytic amphidinol analogs from *Amphidinium carterae* collected in New Zealand [J]. *Harm Alg*, 2005, 4(2): 383–389.
- [63] Kim Y S, Padilla G M. Hemolytically active components of *P. parvum* and *G. breve* toxins [J]. *Life Sci*, 1977, 21(9): 1287–1292.
- [64] An X L(安鑫龙), Yao Q(么强), Li X M(李雪梅). Review on *Chattonella marina* [J]. *J Anhui Agri Sci(安徽农业科学)*, 2010, 38(32): 18281–18283. (in Chinese)
- [65] Zhang Y Y(张玉宇). Ecological studies of phytoplankton and harmful algal blooms in Aotou, Daya Bay, South China Sea [D]. Guangzhou: Jinan University, 2005: 51–53. (in Chinese)
- [66] Jiang T J(江天久), Jiang T(江涛), Zeng M(曾森), et al. Toxicity of red tide alga *Phaeocystis globosa* Scherffel from Zhanjiang against young *Penaeus vannamei* Boone and fish fry [J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, 2006, 14(6): 487–491. (in Chinese)