

海洋卡盾藻(香港株)溶血活性特征研究

江涛¹, 王锐¹, 吴霓^{1,2}, 江天久^{1,2*}

(1. 暨南大学赤潮与水环境研究中心, 广州 510632; 2. 华南师范大学生命科学学院, 广州 510630)

摘要:研究了海洋卡盾藻香港株(*Chattonella marina*, Hong Kong strain, CMHK)在不同生长阶段和营养条件下的溶血活性特征。根据海洋卡盾藻的生长曲线,分别收集对数生长期、稳定期、衰亡期的藻细胞进行溶血毒性的测定;采用不同营养元素结构的培养基对 CMHK 进行培养,对不同培养条件下的藻细胞进行溶血活性的测定;采用对数生长期(5 d)、对数期末期(13 d)、稳定期(15 d)和衰亡期(17 d)的 CMHK 藻液对卤虫进行急性毒性试验。结果表明,培养 5 d 时对数生长期单个藻细胞的溶血活性最强,达到 1.80×10^{-7} HU/cell,此后随培养时间的增加而逐渐降低;不同生长时期 CMHK 单位体积藻细胞的溶血活性与生长曲线基本吻合,对数生长期末期最强,达到 5.32 HU/L;Fe 限制虽然能够显著抑制藻细胞的生长,但藻细胞的溶血活性明显增强,单个藻细胞的溶血活性达到 8.37×10^{-7} HU/cell,为正常培养条件下溶血活性值(1.33×10^{-7} HU/cell)的 6.3 倍。另外,N 限制可使藻细胞的溶血活性值达到 6.67×10^{-7} HU/cell;Mn 和 P 限制也能够导致藻细胞溶血活性增强。不同生长时期的 CMHK 对卤虫的毒性试验结果显示,对数生长期末期的 CMHK 藻液对卤虫的毒性作用最强,卤虫暴露在藻密度为 4.0×10^4 cells/mL 的藻液 48 h 后,死亡率达到 77%,而对数生长期藻液毒性最弱,48 h 卤虫死亡率为 20%。

关键词:海洋卡盾藻;溶血毒素;溶血活性;卤虫;营养盐限制;急性毒性试验

中图分类号:X171.5 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)10-2920-06

Study on Hemolytic Activity of *Chattonella marina* Hong Kong Strain

JIANG Tao¹, WANG Rui¹, WU Ni^{1,2}, JIANG Tian-jiu^{1,2}

(1. Research Center of Harmful Algae & Aquatic Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: Hemolytic activity of *Chattonella marina* Hong Kong strain (CMHK) in different growth phase and nutrients structure was studied under laboratory conditions. According to the growth curve of CMHK, cells in culture were collected in logarithmic phase, stationary phase and decline phase, respectively, to determine hemolytic activity. Hemolytic activity of CHHK, which was cultured in different nutrients structure, was also determined. Furthermore, acute toxicity test of CMHK on *Artemia salina* was performed in early logarithmic phase (5 d), late logarithmic phase (13 d), stationary phase (15 d) and decline phase (17 d). The results showed that the highest hemolytic activity was detected in early logarithmic phase. After 5 d culture, the hemolytic activity reached 1.80×10^{-7} HU/cell, then decreased gradually with culture time increasing. Hemolytic activity of total cells in culture in different growth phase coincided with the growth curve with the maximum reaching 5.32 HU/L in late logarithmic phase. Growth rate of CMHK was greatly depressed by Fe limitation while hemolytic activity per cell was enhanced to 8.37×10^{-7} HU/cell, nearly 6.5 times higher than that with no Fe limitation (1.33×10^{-7} HU/cell). Similarly, N, Mn and P limitation could also increase the hemolytic activity of CMHK. Acute toxicity test of CMHK on *A. salina* showed that the maximum toxicity of the algae appeared at late logarithmic phase. It was found that death rate of *A. sinica* reached to 77% in 48 h when exposed to the algal culture at late logarithmic phase with algae density being 4.0×10^4 cells/mL, and the lowest toxicity on *A. sinica* appeared in early logarithmic phase with death rate of 20%.

Key words: *Chattonella marina* Hong Kong strain; hemolytic toxins; hemolytic activity; *Artemia sinica*; nutrients limitation; acute toxicity test

溶血毒素(hemolytic toxins)是一类广泛存在于赤潮藻中的毒性物质,其作用于血红细胞可使之溶解破裂,其毒理与洋地黄皂甙(digitonin)相似^[1]。溶血毒素能对环境中的其它生物产生毒性效应,从而使产毒藻在竞争中处于优势地位。根据文献统计,目前为止能产生溶血毒素的藻类主要存在于甲藻、针胞藻、蓝藻、硅藻这4个门^[2],不同种属的藻类产生溶血毒素的成分和特征不尽相同。溶血毒素的结构和成分复杂,主要为糖脂类、糖甙类、双半乳糖、聚氧多烯聚醚、大环内酯类和多不饱和脂肪酸类化合物,

也有少数蛋白质和肽类物质。目前为止,只有少数藻类产生的溶血毒素研究比较清楚且能够确定分子结构,如前沟藻(*Amphidinium* sp.)产生的大环内酯类溶血毒素(Amphidinolides)和小定鞭藻(*Prymnesium*

收稿日期:2010-12-05;修订日期:2011-01-19

基金项目:国家自然科学基金重点项目(U0733006);国家重点基础研究发展规划(973)项目(2010CB428702);广东908赤潮灾害调查专项(GD908-01-07);广东908赤潮灾害评价专项(GD908-02-14);海洋赤潮灾害立体监测技术与应用国家海洋局重点实验室开放基金项目(MATHAB200909)

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,E-mail:jiangtaojnu@163.com

* 通讯联系人,E-mail:tjiangtj@jnu.edu.cn

parvum)产生的小定鞭藻毒素(Prymnesins)等^[3,4].

海洋卡盾藻(*Chattonella marina*)是一种鱼毒性赤潮藻,由该藻引发的赤潮已经在世界多处海域造成大量鱼类的死亡.海洋卡盾藻可产生溶血毒素和活性氧(reactive oxygen species, ROS)等致毒物质,但研究结果表明,海洋卡盾藻产生的活性氧浓度远不能达到鱼类的致死浓度^[5,6],溶血毒素在赤潮藻对鱼的毒性中可能起到了关键作用,同时也可能是2种或者多种有毒物质协同作用的结果.海洋卡盾藻溶血毒素粗提液中至少含有4种组分,其中1种为脂类,3种为糖脂类^[7];该类毒素具有光依赖性,只有在光照的条件下才具有溶血活性^[8],但海洋卡盾藻溶血毒素的化学结构尚不清楚.盐度、温度和光照强度对海洋卡盾藻生长和产毒会产生影响,其中盐度是影响海洋卡盾藻产毒的主要因素,低盐条件不利于海洋卡盾藻的生长,但有利于溶血毒素的合成^[9].目前,许多学者对海洋卡盾藻的毒理和生理特性等进行了大量研究,但有关海洋卡盾藻溶血毒素生成与营养元素关系的研究则鲜有报道.本研究对海洋卡盾藻(香港株)在不同生长期和不同营养条件下藻细胞的溶血活性及对卤虫的毒性效应进行了分析,以期揭示海洋卡盾藻溶血毒性的影响因素,为该藻赤潮的防灾减灾提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 藻种

海洋卡盾藻香港株由香港渔农护理署提供,2002年从香港近岸水体中采集并在室内培养至今.

1.1.2 柠檬酸等渗盐溶液

分别称取 NaCl 0.853 g,柠檬酸钠 2.168 g,葡萄糖 4.518 g,溶于200 mL蒸馏水中,用柠檬酸调节pH至7.0后定容至250 mL备用.

1.1.3 0.5%兔红细胞溶液

兔血采自新西兰实验兔,每次抽取兔血不超过4 mL.先将兔血离心,将血清和上层的白细胞弃去.红细胞用pH=7.0的等渗柠檬酸缓冲液洗,重复3次,最后将兔红细胞放于柠檬酸缓冲液中,浓度(体积比)为0.5%,4℃下保存,有效期为7 d.

1.2 实验方法

1.2.1 海洋卡盾藻香港株的批量培养

取对数生长末期的CMHK,采用f/2培养基按1:4的比例接种于2 L锥形瓶中,置于人工气候箱中培养18 d,培养温度22℃,光照强度60

μmol/(m²·s),光暗循环L:D=12:12.每天固定时间(10:30)取藻液于显微镜下计数.

1.2.2 溶血活性标准曲线

溶血活性测定方法参照文献[1,10]的方法,采用洋地黄皂甙(digitonin)作为溶血标准物绘制标准曲线.溶血单位以HU表示,在本研究中,1 HU是指5 mL实验体系中使兔血红细胞溶解50%所需溶血毒素的量.

1.2.3 海洋卡盾藻溶血毒素提取与活性测定

溶血毒素提取参照文献[10]的方法.取CMHK藻液离心10 min(3 000 r/min),收集藻细胞并用甲醇重新悬浮,冰浴条件下超声波破碎.将细胞破碎液进行旋转蒸发,干燥成固体状后溶解于甲醇中(甲醇用量为藻液的1/1 000),然后离心10 min(10 000 r/min),即得溶血毒素粗提液,-18℃下贮存备用.

向试管中加入0.5%的兔血红细胞溶液4 mL、柠檬酸等渗盐缓冲液0.75 mL、溶血毒素粗提液0.25 mL,37℃水浴30 min,离心取上清液于D_{540 nm}测其吸光度.根据洋地黄皂甙的标准曲线,换算其溶血百分数.

1.2.4 海洋卡盾藻不同生长期溶血活性

采用批量培养方式对CMHK进行培养.根据其生长曲线,分别收集对数生长期、稳定期、衰亡期的藻细胞进行溶血毒素的提取和测定.

1.2.5 不同营养元素浓度条件下海洋卡盾藻溶血活性

根据表1配制不同营养元素浓度的培养基,藻种大批量培养按照1.2.1节方法,分别收集不同培养条件下的藻细胞进行溶血毒素的提取和测定.

表1 不同营养元素浓度培养基配方¹⁾/mg·L⁻¹

Table 1 Inorganic nutrient concentration in batch cultures of *C. marina*/mg·L⁻¹

营养元素浓度	氮磷比				
	1.5:1	150:1	15:1	15:1	15:1
NaNO ₃	7.5	75	75	75	75
NaH ₂ PO ₄ ·6H ₂ O	5	0.5	5	5	5
FeCl ₃ ·H ₂ O	—	—	—	0.316	—
MnCl ₂ ·H ₂ O	—	—	—	—	0.018

1) “—”指该营养物质含量与f/2培养基相同

1.2.6 不同生长期海洋卡盾藻对卤虫的急性毒性试验

采用对数生长初期(5 d)、对数期末期(13 d)、稳定期(15 d)和衰亡期(17 d)的CMHK藻液对卤虫进行急性毒性试验,藻细胞密度分别为0.9×10⁴、4.0×10⁴、3.7×10⁴和2.6×10⁴ cells/mL.选用

24 孔板,每孔注入 2 mL 藻液,每个密度 3 个平行,分别随机放入 10 只健康的 4 d 龄卤虫,以同体积人工海水作对照,48 h 内每 6 h 记录卤虫死亡情况.用解剖镜观察,以解剖针触动卤虫约 5 s 卤虫触角不动为死亡标准,用浓度指数-概率单位法计算半致死浓度^[11].

当对照组卤虫出现偶然性死亡时,各浓度组的死亡率按公式(1)进行校正,以扣除卤虫因为饥饿,体质不健壮或互相残杀而死亡对实验造成的误差.

$$P = (P' - C)/(1 - C) \tag{1}$$

式中, P' 为观察死亡率, C 为对照组死亡率, P 为校

正后的死亡率.死亡机率按死亡率-机率单位换算表换算^[11].

2 结果与分析

2.1 溶血活性的标准曲线

洋地黄皂甙浓度与溶血百分数之间的关系如图 1 所示,根据毒理学几率单位法(probit method)换算成浓度对数与溶血几率之间的关系,计算半溶血浓度(LC₅₀),即 1 个溶血单位的浓度,相当于溶血百分数为 50% 时洋地黄皂甙的浓度.溶血百分数与几率单位的换算参考文献[11].

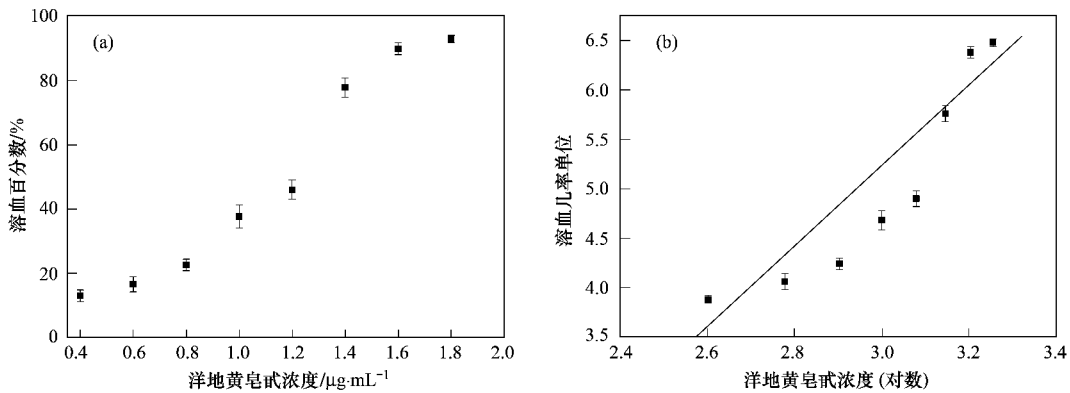


图 1 溶血活性的标准曲线
Fig. 1 Standard curve of hemolysis by digitonin

通过洋地黄皂甙浓度对数与溶血几率经回归统计分析[图 1(b)]得线性回归方程为:

$$y = 4.205x - 7.5626 \quad R^2 = 0.8555, P < 0.01$$

式中, y 为溶血几率单位, x 为洋地黄皂甙浓度对数.

通过换算关系计算得出 LC₅₀ = 0.97 μg/mL,即洋地黄皂甙浓度约为 0.97 μg/mL 时,其溶血百分数为 50%,因此 1 HU 的浓度相当于洋地黄皂甙 0.97 μg/mL,本研究结果小于何家苑等^[1]采用牛血红细胞所得的 LC₅₀ (1.3 μg/mL),与 Kuroda 等^[8]的结果相近.

2.2 不同生长期藻细胞毒素的溶血活性

CMHK 藻细胞溶血活性在不同生长期存在明显差异(图 2).对数生长初期单个藻细胞的溶血活性最强,培养至 5 d 时单个藻细胞溶血活性达到 1.80 × 10⁻⁷ HU/cell,此后随培养时间的增长而逐渐降低,到 16 d 降至 0.96 × 10⁻⁷ HU/cell,仅为对数生长初期溶血活性的 1/2.不同生长时期 CMHK 单位体积藻细胞的溶血活性与生长曲线基本吻合,对数生长末期最强,达到 5.32 HU/L.

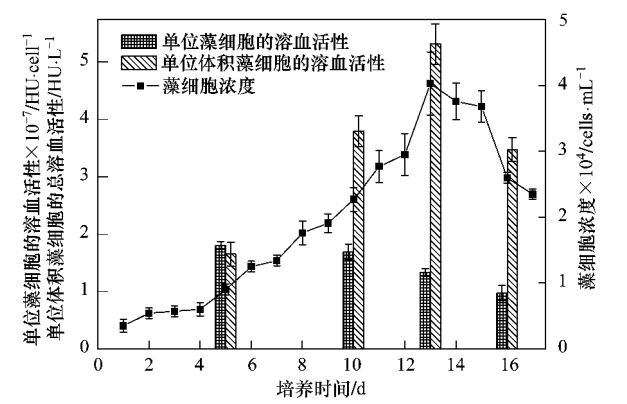


图 2 不同生长期 CMHK 的溶血活性
Fig. 2 Hemolytic activity of *C. marina* Hong Kong strain in different growth phases

2.3 不同营养元素浓度条件下藻细胞的溶血活性

不同营养元素浓度对 CMHK 的生长及其毒素存在显著的影响. Fe 限制条件(Fe³⁺ 初始浓度为 0.316 mg/L)对藻细胞生长的影响最大,导致 CMHK 生长缓慢且较快进入对数生长末期(9 d),此时其藻

细胞密度仅为 1.4×10^4 cells/mL. N 限制条件(NO_3^- 初始浓度为 7.5 mg/L) 也影响 CMHK 的生长,对数生长末期(11 d)藻细胞密度为 2.1×10^4 cells/mL, 高于 Fe 限制(图 3). 在对数生长末期,以正常培养条件下藻细胞密度最大 4.0×10^4 cells/mL, 其次为 Mn 限制(Mn^{2+} 初始浓度为 0.018 mg/L) 和 P 限制(PO_4^{3-} 初始浓度为 0.5 mg/L), 分别为 2.8×10^4 和 3.3×10^4 cells/mL, 三者藻细胞的生长模式相似, 均在 13 d 进入对数生长末期.

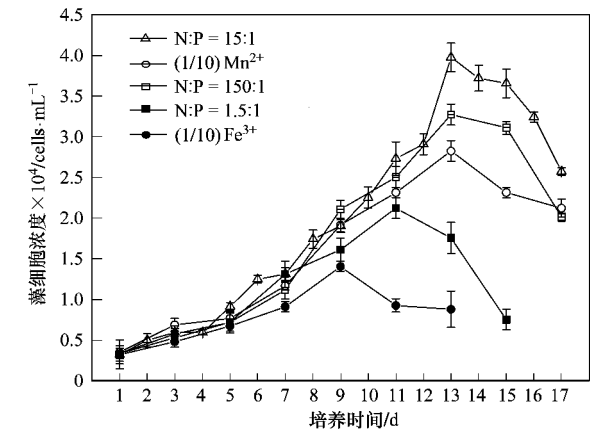
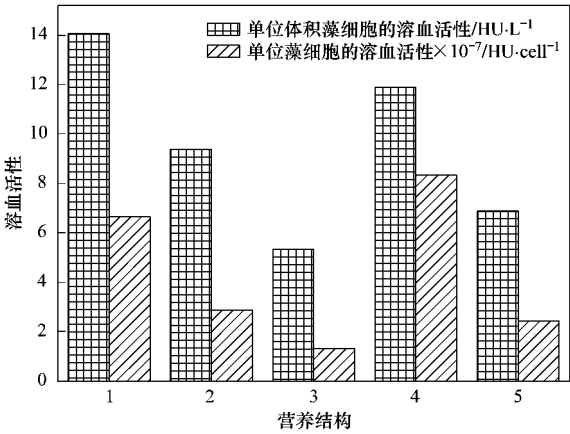


图 3 不同营养条件下 CMHK 的生长曲线
Fig. 3 Growth curves of *C. marina* Hong Kong strain under different nutritional conditions

营养元素不仅影响 CMHK 藻细胞的生长,同时也影响溶血毒素的生物合成. 在 Fe 限制时,单个藻细胞溶血活性最强($8.37 \times 10^{-7} \text{ HU/cell}$), 为 f/2 培养条件下单个藻细胞溶血活性值($1.33 \times 10^{-7} \text{ HU/cell}$)的 6.3 倍; 其次为 N 限制,单个藻细胞的溶血活性值为 $6.67 \times 10^{-7} \text{ HU/cell}$; Mn 和 P 限制对单个藻细胞溶血活性也产生一定影响,分别为 2.45×10^{-7} 和 $2.88 \times 10^{-7} \text{ HU/cell}$, 均高于正常培养条件下单个藻细胞的溶血活性值(图 4).

2.4 不同生长期海洋卡盾藻香港株对卤虫的毒性影响

采用对数生长初期(5 d)、对数生长末期(13 d)、稳定期(15 d)和衰亡期(17 d)的 CMHK 藻液对卤虫进行急性毒性试验(图 5), 结果表明, 对数生长末期的 CMHK 藻液的毒性作用最强, 卤虫暴露在 $4.0 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 藻液 48 h 后, 死亡率达到 77%; 稳定期 CMHK 藻液也具有较强的毒性, 48 h 后卤虫死亡率为 60%; 对数生长初期藻液毒性最弱, 24 h 内无卤虫死亡, 48 h 卤虫死亡率为 20%.



1. N: P = 1.5: 1; 2. N: P = 150: 1; 3. N: P = 15: 1;
4. $1/10[\text{Fe}^{3+}]$; 5. $1/10[\text{Mn}^{2+}]$

图 4 不同营养条件下 CMHK 的溶血活性
Fig. 4 Hemolytic activity of *C. marina* Hong Kong strain under different nutritional conditions

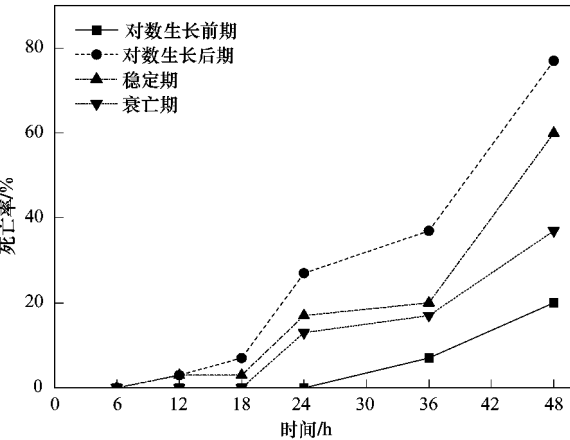


图 5 不同生长期的 CMHK 对卤虫的毒性
Fig. 5 Death rate of *A. salina* exposed in CMHK culture of different growth phase

3 讨论

藻毒素的合成机制非常复杂, 与其生命周期密切相关^[12,13]. 本研究结果表明, CMHK 对数生长初期单个藻细胞的溶血活性最强, 随着培养时间的延长, 单个藻细胞的溶血活性逐渐减小(图 2). CMHK 的产毒情况与亚历山大藻相似, 对数生长初期和中期塔玛雅历山大藻(*Alexandrium tamarensis*) 和链状亚历山大藻(*A. catenella*) 单个藻细胞中麻痹性贝类毒素(PSP) 含量最高, 随后显著下降, 在稳定期 PSP 含量仅为指数生长期的 5% ~ 20%^[14]. 苏惠美^[15] 也证实 *Alexandrium fundyense* 在其对数生长期初期单

位藻细胞内石房蛤毒素(STX)含量最高.但与此相反,球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)在对数生长期并无溶血活性,而在平稳期和衰亡期具有明显的溶血活性,其中衰亡期溶血活性最强^[10];利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*)单位藻细胞OA含量在不同生长期也明显不同,稳定期OA水平最高,与对数中期存在显著差异^[16].

藻类在不同生长期影响其细胞产毒的因素很多,Boczar等^[14]认为PSP毒素在*Alexandrium* sp.藻细胞内的新陈代谢是其含量从指数期到稳定期下降的主要原因.但是,球形棕囊藻和利玛原甲藻分别产生的溶血毒素和OA浓度峰值却出现在稳定期或衰亡期^[10,16],表明这2种藻的产毒机制与*Alexandrium* sp.明显不同.研究表明,藻类毒素的产生可能与某些藻类的自我保护机制有关,随着水体中营养元素不断被消耗,藻类在稳定期或衰亡期合成一些能抑制其他竞争生物生长繁殖的次生代谢产物,从而使产毒藻在竞争中处于优势地位^[10].周成旭等^[17]研究了不同生长期微小卡罗藻溶血活性,结果显示该藻在整个生长期均存有较高溶血活性,从而推测微小卡罗藻的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生成的次生代谢产物.本研究结果与Boczar等^[14]相似,但单个藻细胞的溶血活性随着培养时间的增加而逐渐减小的原因尚不清楚,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.

水体中营养元素组成和结构影响赤潮藻类的生长和毒素的合成.齐雨藻^[2]调查海洋卡盾藻赤潮发生前后水体环境理化和气象因子的动态变化,认为铁元素作为环境要素对该赤潮的形成起着决定性的作用,而营养盐则起着基础的作用.渡边正孝^[18]的围隔实验也证实铁元素对海洋卡盾藻藻的生长具有显著促进作用.与此相似,本研究结果显示,与N、P和Mn相比, Fe^{3+} 对CMHK藻生长影响最大,在Fe限制的情况下,其对数生长期明显缩短,藻密度最大值仅为正常培养时的1/3;另外,氮限制也对藻细胞生长影响显著(图3).在毒素合成方面,Fe和N限制条件下,虽然CMHK藻细胞的生长受到限制,但溶血毒素的合成能力大大增强,单个藻细胞的溶血活性明显高于其他培养条件(图4).另外,Mn和P限制也在一定程度上刺激溶血毒素的合成.刘洁生等^[19]对球形棕囊藻溶血活性的研究结果与本研究相似,Fe和N限制对该藻溶血毒素活性的影响最为显著.Johansson等^[20,21]对不同N:P培养条件下

*Chrysochromulina polylepis*和*Prymnesium parvum*的溶血活性研究发现,N限制和P限制都能够增强藻细胞溶血活性.营养元素限制还影响不同结构和性质的其他藻毒素的合成,如P限制下*Alexandrium tamarense*藻细胞中PSP毒素产量增加^[22,23],N和P限制下*Prorocentrum lima*^[24]和*Dinophysis acuminata*^[25]藻细胞中OA含量增加.值得注意的是,营养元素对毒素合成影响的化学机制至今仍不清楚.

CMHK藻液对卤虫的毒性试验结果显示,对数生长期初期藻液毒性最弱,对数生长末期藻液毒性最强,藻液对卤虫的毒性似与单个藻细胞的溶血活性无关,而与单位体积藻细胞的溶血活性(稳定期溶血活性没有测定)和藻细胞密度存在一定的相关性(图2、5).实验中观察到,暴露于高密度海洋卡盾藻藻液中(尤其是对数生长期末期)的卤虫常常与藻细胞群体粘附在一起,直接影响卤虫的运动,海洋卡盾藻的细胞表面黏性分泌物也可能是造成卤虫死亡的原因之一.海洋卡盾藻可产生多种有毒物质,如神经毒素(neurotoxin)、溶血毒素、活性氧(reactive oxygen species, ROS)和游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)等,这些物质可能是导致鱼类等海洋生物死亡的主要原因^[6,26].尽管先前的研究表明^[7],CMHK粗提液中至少含有4种溶血毒素成分,但就本研究而言,藻液对卤虫的毒性表现出明显的剂量效应关系既可能是由于毒素的致毒作用,也可能是藻细胞外粘性物质的物理作用结果,理想的方法是直接测定CMHK粗提液对卤虫的毒性,这也是作者下一步将要进行的工作.CMHK藻液对卤虫的毒性试验结果也表明,在CMHK赤潮后期,其对海洋水体中的浮游动物影响更大,在有害赤潮跟踪监测中应特别注意.

4 结论

(1)海洋卡盾藻(香港株)对数生长期初期单个藻细胞的溶血活性最强,此后随培养时间的增加而逐渐降低;单位体积藻细胞的溶血活性与生长曲线基本吻合,对数生长末期最强,达到5.32 HU/L.

(2)Fe限制能够显著抑制海洋卡盾藻(香港株)的生长,但藻细胞的溶血活性明显增强,单个藻细胞的溶血活性达到 8.37×10^{-7} HU/cell.另外,N、Mn和P限制也能够导致藻细胞溶血活性增强.

(3)对数生长期初期海洋卡盾藻(香港株)藻液对卤虫毒性最弱,对数生长末期藻液毒性最强,藻液对

卤虫的毒性与单位体积藻细胞的溶血活性和藻细胞密度存在一定的相关性。

参考文献:

- [1] 何家苑, 陈明惠, 何振荣. 小定鞭藻毒素的分离和鉴定[J]. 水生生物学报, 1996, **20** (1): 41-48.
- [2] 齐雨藻. 中国南海赤潮研究[M]. 广州: 广州经济出版社, 2008.
- [3] Kobayashi J, Kubota T. Bioactive macrolides and polyketides from marine dinoflagellates of the genus *Amphidinium* [J]. Journal of Natural Product, 2007, **70** (3): 451-460.
- [4] Yasumoto T. The chemistry and biological function of natural marine toxins[J]. The Chemical Record, 2001, **1** (3): 228-242.
- [5] Tang J Y M, Anderson D M, Au D W T. Hydrogen peroxide is not the cause of fish kills associated with *Chattonella marina*: cytological and physiological evidence[J]. Aquatic Toxicology, 2005, **72** (4): 351-360.
- [6] Marshall J A, Nichols P D, Hamilton B. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids[J]. Harmful Algae, 2003, **2** (4): 273-281.
- [7] 张文, 江天久, 王锐. 海洋卡盾藻(香港株)溶血毒素的提取和分离[J]. 生态科学, 2008, **27** (6): 457-463.
- [8] Kuroda A, Nakashima T, Yamaguchi K. Isolation and characterization of light-dependent hemolytic cytotoxin from harmful red tide phytoplankton *Chattonella marina* [J]. Comparative Biochemistry and physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology, 2005, **141** (3): 297-305.
- [9] 黄娟, 杨维东, 刘洁生, 等. 温度、盐度、光照对海洋卡盾藻生长和产毒的影响[J]. 应用生态学报, 2009, **20** (5): 1190-1195.
- [10] 彭喜春, 杨维东, 刘杰生, 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.
- [11] 周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性试验方法[M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- [12] Chan K L, New D, Ghandhi S. Transcript levels of the eukaryotic translation initiation factor 5A gene peak at early G1 phase of the cell cycle in the dinoflagellate *Cryptocodinium chnii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68** (5): 2278-2284.
- [13] Sivonen K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, **56** (9): 2658-2666.
- [14] Boczar B A, Beitler M K, Liston J. Paralytic shellfish toxin in *Protogonyaulax tamarens* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture [J]. Plant Physiology, 1988, **88** (4): 1285-1290.
- [15] 苏惠美. 台湾株塔玛藻的生物特性研究[D]. 台湾: 台湾大学海洋研究所, 1989.
- [16] 李丽璇, 汤敬谦, 杨维东. 海洋底栖甲藻-利玛原甲藻 (*Prorocentrum lima*) 产毒特征的研究[J]. 生态毒理学报, 2009, **4** (5): 745-750.
- [17] 周成旭, 傅永静, 陈清峰. 微小卡罗藻溶血活性的生长期特征及其溶血毒素种类分析[J]. 海洋学报, 2009, **31** (2): 146-152.
- [18] 渡边正孝. 日本播磨滩卡盾氏藻 (*Chattonella*) 赤潮的发生机理[J]. 现代渔业信息, 1994, **9** (5): 19-22.
- [19] 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.
- [20] Johansson N, Graneli E. Cell density, chemical composition and toxicity of *Chrysochromulina polylepis* (Haptophyta) in relation to different N:P supply ratios[J]. Marine Biology, 1999, **135** (2): 209-217.
- [21] Johansson N, Graneli E. Influence of different nutrient conditions on cell density, chemical composition and toxicity of *Prymnesium parvum* (haptophyta) in semi-continuous cultures[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1999, **239** (2): 243-258.
- [22] Anderson D M, Kulis D M, Sullivan J J. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. [J]. Marine Biology, 1990, **104** (3): 511-524.
- [23] Wang D Z, Hsieh D P H. Effects of nitrate and phosphate on growth and C2 toxin productivity of *Alexandrium tamarens* Cl01 in culture[J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, **45** (1): 286-289.
- [24] McLachlan J L, Marr J C, Conlon-Kelly A, et al. Effects of nitrogen concentration and cold temperature on DSP-toxin concentrations in the dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Prorocentrales, Dinophyceae) [J]. Natural Toxins, 1994, **2** (5): 263-270.
- [25] Sohet K, Pereira A, Braeckman J C. Growth and toxicity of *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) dodge in different culture media: effects of humic acids and organic phosphorus [A]. In: Lassus P. Harmful Marine Algal Blooms [C]. New York: Lavoisier Intercept, 1995. 669-674.
- [26] Okaichi T. Marine environmental studies on outbreaks of red tides in neritic waters[J]. Journal of Oceanography, 1983, **39** (5): 267-278.