

东海大规模赤潮危害影响的实验研究^{*} ——对黑褐新糠虾和卤虫的毒性效应

颜 天¹ 张 艺^{1,2} 韩 刚^{1,2} 陈 洋^{1,2} 周名江¹

(¹中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(²中国科学院研究生院, 北京 100049)

近年来, 东海长江口邻近海域连年爆发覆盖面积广、持续时间长的大规模东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 赤潮 (最高密度达 10^7 cells/mL) (Zhou, 2001), 在某些区域, 链状亚历山大藻 (*Alexandrium catenella*) 赤潮 (最高密度达 10^5 cells/mL) 也伴随发生 (周名江等, 2003)。2005 年还发生了大面积的米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*) 赤潮 (孙军等, 2006)。作者针对赤潮危害的形成机制和进一步了解大规模赤潮的发生对整个海洋生态的影响展开了系列研究。

黑褐新糠虾 (*Neomysis awatschensis*) 是广泛分布于我国沿海的一种小型甲壳生物, 多生活于近岸水域, 为广温广盐种, 与对虾亲缘关系较近 (郑严, 1982), 经驯化已在中科院海洋研究所海水实验室实现连代培养。卤虫 (*Artemia salina*) 是一种鳃足类甲壳动物, 近年来已被广泛应用于有害赤潮藻 (如亚历山大藻和原甲藻) 的毒性研究 (Demaret et al., 1995; Lush et al., 1995; 颜天等, 2003), 其卵可以在实验室内进行孵化而得到大量的均匀个体, 且其可以直接滤食和接触有害藻, 因而是一种研究有害赤潮藻毒性效应的理想实验生物。美国国家环保局 (EPA) 已把它列为污染物毒性检测的标准实验生物 (USEPA, 2003)。

作者以黑褐新糠虾和卤虫为实验对象, 对东海大规模赤潮的主要原因种东海原甲藻 (*P. donghaiense*)、米氏凯伦藻 (*K. mikimotoi*)、链状亚历山大藻 (*A. catenella*) 以及其他 11 株亚历山大藻对其存活和生长影响进行了研究, 并初步分析了东海大规模赤潮可能对海洋养殖业和海洋生态系统造成的危害。

一、材料与方 法

1. 实验材料

东海原甲藻 (*P. donghaiense*) 和链状亚历山大藻 (*A. catenella*) 分离自中国东海长江口

^{*}中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX2-YW-208), 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2001CB409709)。

通信作者: 颜天, 研究员, 主要从事赤潮危害机制研究; Email: tianyan@ms.qdio.ac.cn 联系电话: 0532-82898589

收稿日期: 2006 年 12 月 21 日。

海域(由赤潮 973 项目提供), 米氏凯伦藻(*K. mikimotoi*)分离自胶州湾(由中国海洋大学提供)。实验所用其他 11 株亚历山大藻中, *A. lusitanicum*(AL-1)购自美国 Bigelow 海洋研究所的海洋浮游植物培养中心(Culture Center of Marine Phytoplankton, CCMP), 微小亚历山大藻 *A. minutum*(AM-1)分离自中国台湾(由 Dr. Chou 提供), *Alexandrium* spp. (A-K)分离自韩国沿海, 5 株塔玛亚历山大藻 *A. tamarense* (ATHK, ATC02, ATC03, AT5-1, AT5-3 和 2 株 *A. affine* AS-1, AC-1)均分离自中国南海。不产麻痹性贝毒毒素 PSP 的塔玛亚历山大藻(AT-6)由 Dr. Anderson 提供, 以上所有藻种在实验室内以 f/2-S 培养液单种培养, 作为对照的小球藻(*Chlorella vulgaris*)由中科院海洋所种质库提供, 用绿藻培养液单种培养。所有藻种的培养条件为: 温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照 3000 lx, 光暗比 14L:10D。黑褐新糠虾(*N. awatschensis*)采集于胶州湾西海岸, 在本实验室内多年多代连续培养。实验用卤虫为低温保藏的、经海水孵化 3~4 d 的无节幼体卤虫卵, 卤虫卵产自青海尕斯库勒湖。海水取自青岛胶州湾外太平角无污染海水, 使用前经沉淀砂滤, $0.45 \mu\text{m}$ 混合纤维滤膜抽滤后高温消毒, 用 ATAGO 手提式盐度计测定盐度。

2. 实验方法

1) 赤潮藻对黑褐新糠虾存活的影响实验

东海原甲藻和米氏凯伦藻实验设: 对照、 1×10^4 cells/mL, 2×10^4 cells/mL, 5×10^4 cells/mL 及 1×10^5 cells/mL 5 个实验组; 链状亚历山大藻实验设: 对照、500 cells/mL, 2500 cells/mL, 5000 cells/mL 及 7500 cells/mL 5 个实验组。对照组均投喂生长良好、处于指数增长期的小球藻(密度为 1×10^6 cells/mL), 每组 3 个平行。选取 5 (± 1) 日龄、健康活泼的糠虾幼体, 以随机方式加入烧杯中, 每杯 10 尾, 每个实验组 3 个平行。实验期间不间断通气, 温度用控温仪恒温水浴控制在 $22 (\pm 1)^\circ\text{C}$, 每天投喂等量活卤虫。每 24 h 吸取杯底污物和死虾, 记录死亡糠虾数, 48 h 更换藻液, 记录 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 时糠虾的死亡数。

其他 11 株亚历山大藻对黑褐新糠虾存活影响实验中藻密度均设置为 4000 cells/mL, 实验水体 1000 mL, 实验方法同上。

2) 赤潮藻对卤虫存活与生长的影响实验

(1) 3 株赤潮藻对卤虫存活的影响实验。东海原甲藻和米氏凯伦藻实验组设: 对照、 1×10^4 cells/mL, 2×10^4 cells/mL, 5×10^4 cells/mL 及 1×10^5 cells/mL; 链状亚历山大藻实验设: 对照、饥饿、100 cells/mL, 200 cells/mL, 500 cells/mL, 1000 cells/mL。对照组均投喂生长良好、处于指数增长期的小球藻(密度为 1×10^6 cells/mL), 饥饿组为实验室经沉淀过滤海水, 每组 3 个平行。用消毒海水将藻液稀释至各实验密度, 然后分别加入 12 孔板中, 每孔加入实验液 5 mL, 每孔内放入个体大小均匀的 2 日龄卤虫 10 尾。实验在温度为 $20 (\pm 1)^\circ\text{C}$, 盐度为 31 (± 1), pH 为 7.3 条件下进行 96 h。以解剖针触动卤虫 5 s, 以其触角不动作为死亡标准, 96 h 时计数其存活数, 计算死亡率。

(2) 11 株亚历山大藻对卤虫存活的影响实验。选取孵化 3~4 d 的卤虫无节幼体用于实

验，分别取处于指数生长中期的 11株亚历山大藻，用 0.5mL计数框准确计数后，用消毒海水稀释为 500 cells/mL、1000 cells/mL、2000 cells/mL、4000 cells/mL 4个密度组。对照组均投喂生长良好、处于指数增长期的小球藻（密度为 1×10^6 cells/mL），饥饿组为实验室经沉淀过滤海水，每组 3个平行。实验容器为 12孔板，每孔加入实验液 5 mL，每孔内放入个体大小均匀的 2日龄卤虫 10尾，实验在温度为 20（ ± 1 ） $^{\circ}\text{C}$ ，盐度为 31（ ± 1 ），PH为 7.3条件下进行 96 h，每隔 12 h用蒸馏水调整盐度，每 24 h计数卤虫幼体存活数，48 h更换实验液。

（3）赤潮藻对卤虫生长的影响实验。实验设计与存活实验相同，实验开始时，随机量取 10只卤虫幼体的体长，取平均值为实验起始时卤虫体长，实验结束时，从各实验组中随机量取 10只存活的卤虫幼体体长，对于存活数不足 10只的实验组，全部量取，取平均值即为实验结束时卤虫的体长。

3. 数据处理

实验数据用 SPSS软件分析，所有数据用 ANOVA进行统计差异分析，实验结果用平均值 $\pm$ 标准误差表示，以 $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

二、实验结果

1. 赤潮藻对黑褐新糠虾和卤虫存活的影响

1) 3株赤潮藻对黑褐新糠虾和卤虫存活的影响

图 1，图 2是东海原甲藻、米氏凯伦藻和链状亚历山大藻对黑褐新糠虾和卤虫存活的影响。从图中可见在实验密度范围内，96 h时，东海原甲藻和米氏凯伦藻对黑褐新糠虾和卤虫的存活未产生明显的不利影响（ $P>0.05$ ），但链状亚历山大藻显著降低了黑褐新糠虾和卤虫的存活率，这种不利影响与其藻密度成正相关，其 96 h存活率分别为 4500 cells/mL和 460 cells/mL(图 3 图 4)。

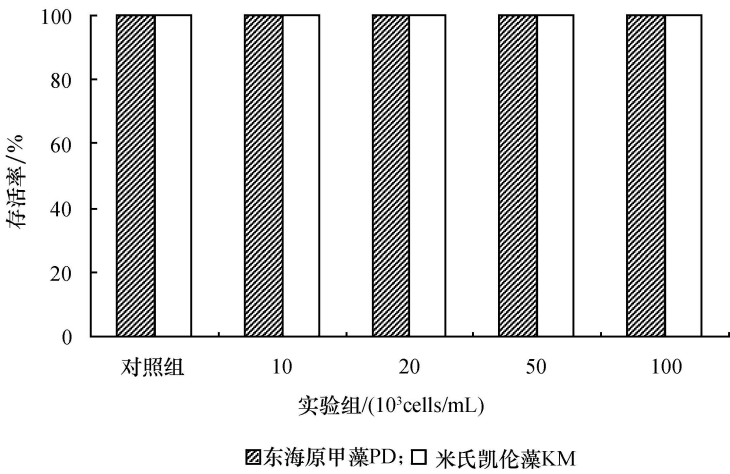


图 1 东海原甲藻和米氏凯伦藻在 96 h 时对黑褐新糠虾存活的影响

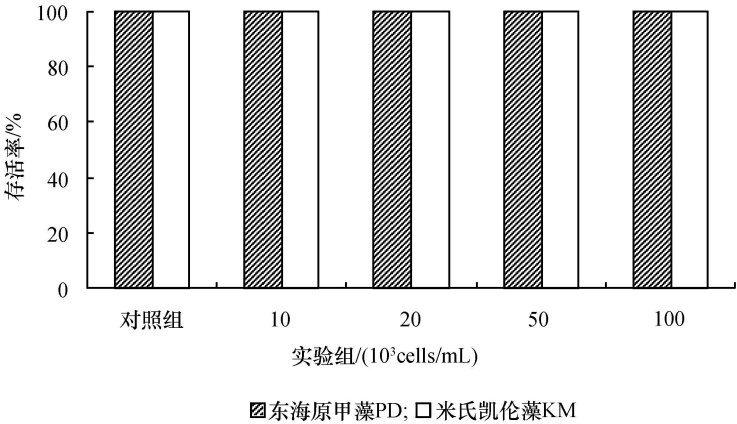


图 2 东海原甲藻和米氏凯伦藻在 96 h 时对卤虫存活的影响

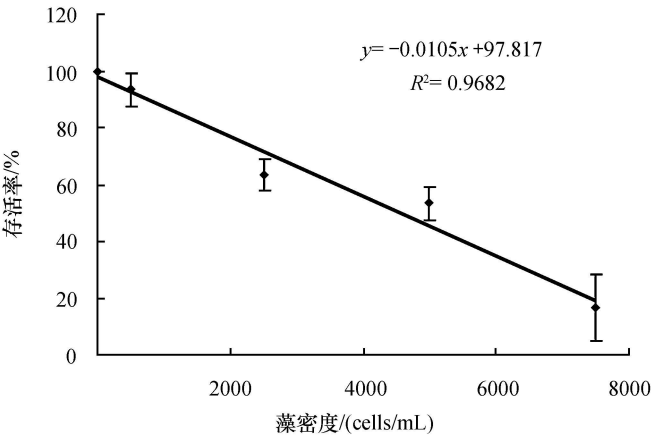


图 3 链状亚历山大藻 96 h 时对黑褐新糠虾存活的影响

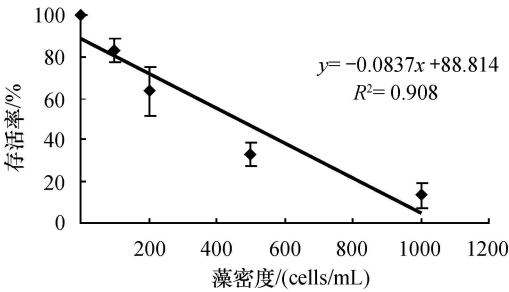


图 4 链状亚历山大藻 96 h 时对卤虫存活的影响

2) 11株亚历山大藻对黑褐新糠虾和卤虫存活的影响

从图 5可以看出, *A. spp.* (A-K)、*A. lusitanicum* (AL-1)、*A. tamarense* (AT5-3和 AT6) 和 *A. affine* (AS-1)在密度 4000 cells/mL时, 96 h内对黑褐新糠虾的存活无明显的不利影响 ($P>0.05$), 而 *A. tamarense* (AT5-1、ATHK、ATC02、ATC03)和 *A. affine* (AC-1)均明显地降低了黑褐新糠虾的存活率 ($P<0.05$), 微小亚历山大藻 *A. minimum* (AM-1)则极显著的降低了黑褐新糠虾的存活率 ($P<0.01$)。11株亚历山大藻在 500 cells/mL时对卤虫存活的影响结果如图 6所示, 除了塔玛亚历山大藻 AT-6和 *A. lusitanicum* (AL-1)外, 其他 9株亚历山大藻, 包括 5株塔玛亚历山大藻 (ATHK、AT5-1、AT5-3、ATC02、ATC03)、2株 *A. affine* (AC-1、AS-1)、微小亚历山大藻 (AM-1)及 *A. spp.* (A-K)均对卤虫的存活有十分明显的不利影响 ($P<0.01$), 96 h时卤虫的存活率明显低于饥饿组。

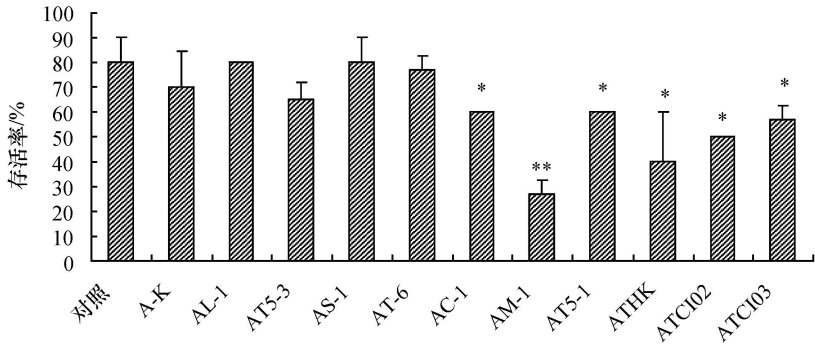


图 5 11株亚历山大藻对黑褐新糠虾存活的影响
(*: $P<0.05$ **: $P<0.01$)

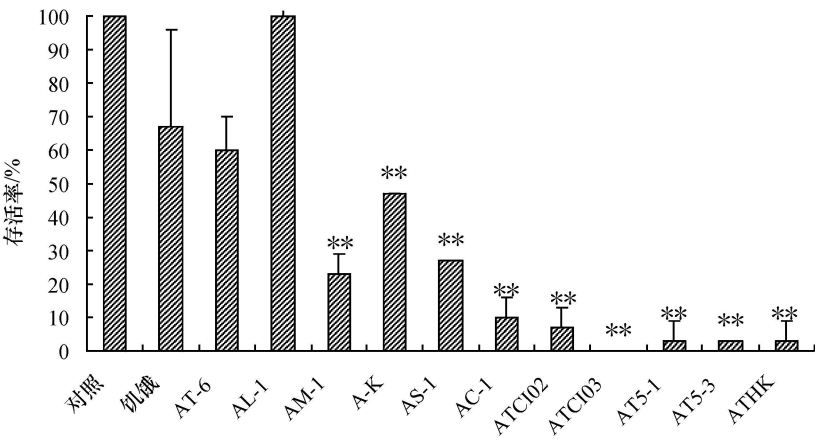


图 6 11株亚历山大藻对卤虫存活的影响
(**): $P<0.01$)

综上所述，*A. tamarense* (AT5-1、ATHK、ATC02、ATC03)、*A. affine* (AC-1) 和 *A. minutum* (AM-1) 共 6 株藻对黑褐新糠虾存活产生影响，其他 5 株均对其存活未产生影响。而对于卤虫来说，这 11 株藻株中，9 株亚历山大藻均对卤虫的存活有十分明显的不利影响，只有 AT-6 和 *A. lusitanicum* (AL-1) 两株对卤虫无影响。另外，对黑褐新糠虾存活产生影响的 6 株藻的密度 (4000 cells/mL) 也远远高于对卤虫存活产生影响的 9 株藻的密度 (500 cells/mL)。因此，与黑褐新糠虾相比，卤虫对有害有毒藻的毒性反应更敏感。

表 1 12 株亚历山大藻对卤虫和黑褐新糠虾存活的影响与 PSP 毒素的关系

种名	株系	分离地	PSP毒素	对卤虫的影响	对糠虾的影响
<i>A. tamarense</i>	ATC02	南海	有	+	+
<i>A. tamarense</i>	ATC03	南海	有	+	+
<i>A. tamarense</i>	AT5-1	南海	有	+	+
<i>A. tamarense</i>	ATHK	南海	有	+	+
<i>A. minutum</i>	AM-1	南海	有	+	+
<i>A. catenella</i>	ACDH	东海	有	+	+
<i>A. tamarense</i>	AT5-3	南海	有	+	—
<i>A. lusitanicum</i>	AL-1	葡萄牙	有	—	—
<i>A. affine</i>	AC-1	南海	无	+	+
<i>A. affine</i>	AS-1	南海	无	+	—
<i>A. sp.</i>	A-K	韩国	未知	+	—
<i>A. tamarense</i>	AT-6	未知	无	—	—

注：“+”：存活率显著降低；“—”：存活率无显著变化。

12 株亚历山大藻对卤虫和黑褐新糠虾存活的影响与其产 PSP 毒素的关系如表 1 (Li Ping Wang et al., 2005) 所示。同样产 PSP 毒素的亚历山大藻，其中塔玛亚历山大藻 (AT5-1、ATHK、ATC02、ATC03)、微小亚历山大藻 (AM-1) 和链状亚历山大藻 (ACDH) 显著降低了卤虫和糠虾的存活率；塔玛亚历山大藻 (AT5-3) 显著抑制卤虫的存活，但对糠虾的存活无明显不利影响；*A. lusitanicum* (AL-1) 对卤虫和糠虾的存活均无不利影响。利用 HPLC 进行毒素分析证实不产生 PSP 毒素的 2 株 *A. affine* (AC-1、AS-1) 中，AC-1 对卤虫和糠虾的存活均有明显的不利影响，AS-1 也导致卤虫的存活率明显降低。因此在本实验中并未发现卤虫和糠虾的存活率降低与 PSP 毒素有直接的关系，可能存在其他未知的毒性物质或危害机制。

2. 赤潮藻对卤虫生长的影响

1) 2 株赤潮藻对卤虫生长的影响

图 7 是 96 h 时米氏凯伦藻和东海原甲藻对卤虫的生长有十分显著的促进作用，各密度组卤虫体长均明显超过了投喂小球藻的对照组，这表明东海原甲藻和米氏凯伦藻不仅可以维持卤虫的生存，还能维持其生长。

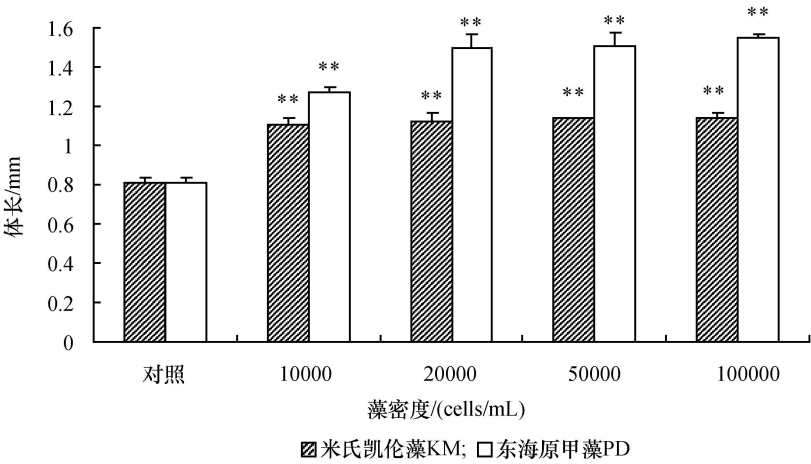


图 7 米氏凯伦藻和东海原甲藻对卤虫生长的影响
(**: $P < 0.01$)

2) 塔玛亚历山大藻 AT6和 AL-1 对卤虫生长的影响

从图 8可以看出，96 h时塔玛亚历山大藻 AT6各密度组卤虫体长均与饥饿相近，与对照组差异显著，且随着藻密度的增加，卤虫体长无明显变化。亚历山大藻 AL-1各密度组卤虫体长均与饥饿组差异显著，且卤虫体长随藻密度的增加而增加，这表明 AL-1 不仅能维持卤虫的生存，也可以维持其正常的生长。

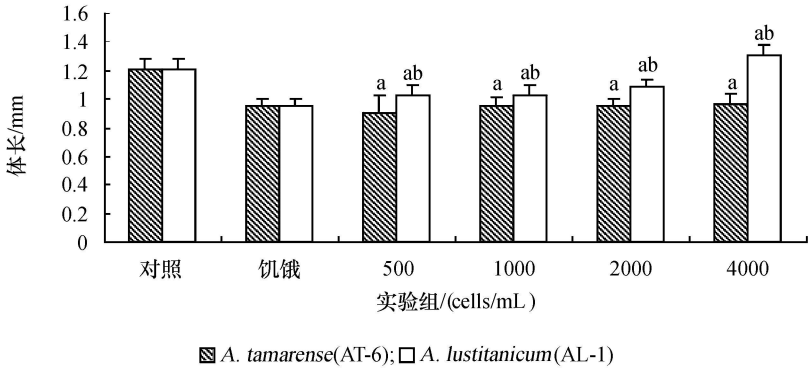


图 8 塔玛亚历山大藻 AT6和 A lusitanicum对卤虫生长的影响
(^a 与对照组有显著差异；^b 与饥饿组有显著差异)

三、讨 论

1. 东海大规模赤潮对甲壳类生物的毒性效应和危害机制

本研究发现，东海原甲藻和米氏凯伦藻在 96 h内均对黑褐新糠虾的存活无不利影响，在较长时间暴露后，两种藻对成体糠虾的产仔虾量有一定抑制作用， 5×10^4 cells/mL的
?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://w

东海原甲藻中成体糠虾产仔虾量是对照组的 80%，而 1×10^4 cells/mL 的米氏凯伦藻导致成体糠虾产仔虾量降为对照组的 20% (韩刚, 2006)，可见，长时间东海原甲藻和米氏凯伦藻大规模赤潮可能对黑褐新糠虾存在慢性毒性效应。

2. 亚历山大藻存在新的危害机制

已往研究发现：多株亚历山大藻均能产生非 PSP 毒素的未知毒性物质，如：Lush (1996) 等的研究发现微小亚历山大藻 (*A. minutum*) 导致的卤虫大量死亡可能是由藻细胞分泌到水体中的其他有害物质造成的 (Lush G J et al., 1996; Simonsen S et al., 1995)；王丽平等这种未知毒性物质在多株亚历山大藻中普遍存在 (Liping Wang et al., 2005)，与亚历山大藻产生的位于细胞表面或分泌到水体中的其他有害物质或其他危害机制有关 (Yan T et al., 2001)。因此，亚历山大藻除能产生 PSP 毒素外，还可能产生其他毒性物质，通过不同的途径危害各种海洋生物。

3. 不同甲壳类生物对赤潮藻的敏感性比较

本研究发现，即使对于同一株藻，黑褐新糠虾和卤虫所受的危害程度也不同。这可能与它们的生理结构、代谢途径和摄食方式等不同有关。卤虫是一种鳃足类甲壳生物，主要以单细胞藻类为食，可以直接摄入和接触大量藻细胞，而且它的鳃裸露，容易受到有毒藻产生的毒性物质的侵害，因此，它除了可能通过摄入的毒素或未知毒性物质而受到毒害外，还可能通过碰撞活体藻细胞表面、促藻产毒而受害；黑褐新糠虾不摄食藻细胞，而且其鳃和躯体外都有甲壳保护，因此可能不易受到这些毒性物质的直接毒害，但毒素可以经卤虫而传递到其体内而产生危害，也可能通过其捕食或吞水过程中摄入少量藻细胞或体表接触藻细胞或胞外毒性物质而受到危害。黑褐新糠虾和卤虫这两种生物对塔玛亚历山大藻或赤潮异弯藻的反应不同。虽然其二者都属于甲壳类生物，但对同种赤潮藻的毒性反应却可能不同 (颜天等, 2004)，因此，建议在今后的赤潮危害评价过程中，尽量选取多种不同的海洋生物作为研究对象，以更全面地反映有害赤潮的危害效应。

综上所述，在短期内，东海原甲藻和米氏凯伦藻赤潮对甲壳类浮游动物影响不明显，但多种亚历山大藻赤潮可能会通过非 PSP 类毒性物质明显影响海洋甲壳类生物的存活。对于具有代表性的两种甲壳类生物——黑褐新糠虾和卤虫来说，卤虫敏感性更高。

参考文献

- 韩刚. 2006. 东海大规模赤潮对中华蛭水藻和黑褐新糠虾的生态毒理学研究 (答辩论文)
- 孙军, 宋书群, 王小冬, 王宗灵, 朱明远. 2006. 初析东海中华哲水蚤选择性摄食对米氏凯伦藻水华过程的影响. 南中国海红潮的关键研究, 262 ~ 267
- 颜天, 谭志军, 李钧, 于仁诚, 王云峰, 周名江. 2004. 塔玛亚历山大藻和赤潮异弯藻对黑褐新糠虾和卤虫的急性毒性作用. 海洋学报, 26(1): 76 ~ 81
- 颜天, 周名江, 傅萌, 于仁诚等. 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
- 周名江, 颜天, 邹景忠. 2003. 长江口邻近海域赤潮发生区基本特征初探. 应用生态学报, 14(7): 1031 ~ 1038
- 郑严. 1982. 黑褐新糠虾生物学的研究. I. 种群和生殖特点 [J]. 海洋与湖沼, 13(1): 67 ~ 77

- Dumaret A, Sohet K, Houvenaghe J G. 1995. Effects of toxic dinoflagellates on the feeding and mortality of *Artemia salina* larvae. In: Lassus P, Arzul G, Erardle D E et al ed. *Harmful Marine Algal Blooms*. Paris: Lavoisier, 427 ~ 432.
- Li Ping Wang, Tian Yan, Ren Cheng Yu, Ming Jiang Zhou. 2005. Experimental study on the impact of dinoflagellate *Alexandrium* species on populations of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Harmful Algae* 4 (2): 371 ~ 382.
- Lush G J, Hallegraeff G M. 1996. High toxicity of the red tide dinoflagellate *Alexandrium minutum* to the brine shrimp *Artemia salina*. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y ed. *Harmful and toxic algal blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 389 ~ 392.
- Simonsen S, Møller B L, Larsen J et al. 1995. Hemolytic Activity of *Alexandrium tamarense*. In: Lassus P, Arzul G, Erardle D E ed. *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, New York, 513 ~ 517.
- USEPA EPA-600/4-74-004. 1983. Proceedings of seminar on methodology for monitoring the marine environments [S]. United States environmental protection agency (USEPA).
- Yan T, Zhou M J, Fu M et al. 2001. Inhibition of egg hatching success and larvae survival of the scallop *Chlamys farreri* associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. *Toxicology* 39: 1239 ~ 1244.
- Zhou M-J (周名江), Zhu M-Y (朱明远), Zhang J (张经). 2001. Status of harmful algal blooms and related research activities in China. *Life Sci (生命科学)*, 13(2): 54 ~ 59 (in Chinese).

EXPERIMENTAL STUDY ON THE HARMFUL EFFECTS OF LARGE-SCALE HABs IN THE EAST CHINA SEA — THE TOXICITY TO *NEOMYSIS AWATSCHEWENSIS* AND *ARTEMIA SALINA*

YAN Tian¹ ZHANG Yi² HAN Gang² CHEN Yang² ZHOU Mingjiang²

(¹Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

(²Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

ABSTRACT

The effects of *Prorocentrum donghaiense*, *Karenia mikimotoi*, *Alexandrium catenella*, the causative species of Harmful Algal Blooms in the East China Sea, on the survival and growth of *Neomysis awatschensis* and *Artemia salina* were investigated. And the toxicity of eleven strains of *Alexandrium*—*A. lusitanicum* (AL-1), *A. minutum* (AM-1), *A. spp.* (A-K), *A. tamarense* (ATHK, ATC02, ATC03, AT5-1, AT5-3, AT6), *A. affine* (AS1, AC1) to the two above organisms were compared. The results showed that *P. donghaiense* and *K. mikimotoi* had no adverse effect on the survival and growth of *N. awatschensis* and *A. salina* at 96 h. However, the survival rate of *N. awatschensis* and *A. salina* declined linearly with the increasing density of *A. catenella*, and the 96 h LC_{50} for *N. awatschensis* and *A. salina* was 4500 and 460 cells/mL, respectively. Five strains of *Alexandrium*—*A. spp.*, *A. lusitanicum* (AL-1), *A. tamarense* (AT5-3, AT6) and *A. affine* (AS1) at the density of 4000 cells/mL

and 96 h had no adverse impacts on *N. awatschensis*. But other six strains of *Alexandrium*——*A. tamarense* (AT5-1, ATHK, ATC02, ATC03), *A. affine* (AC-1) and *A. minutum* (AM-1) decreased the survival rate of *N. awatschensis* significantly. Two strains of *Alexandrium*——*A. lusitanicum* (AL-1) and *A. tamarense* (AT-6), at the density of 500 cells/mL had no adverse effects on *A. salina* in 96 h, while the other *Alexandrium* strains all had adverse effects on the survival of *A. salina*. *A. salina* could increase its length with the increasing density of *P. donghaiense*, *K. mikimotoi* and *A. lusitanicum*. The results indicate that *P. donghaiense* and *K. mikimotoi* have no significant effect on the survival of crustacean zooplankton in a short period. But several *Alexandrium* species/strains could influence the survival of crustacean zooplankton likely by non-PSP substances. *A. salina* is shown to be more sensitive than *N. awatschensis* as test organisms to harmful species.