

厦门西海域裸甲藻和原甲藻赤潮的观察

侯建军^{1,2,3}, 黄辉⁴, 雷红灵³, 赖红艳^{1,3}, 黄邦钦²

(1. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070; 2. 厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005; 3. 湖北省生物资源保护与利用重点实验室, 湖北民族学院, 湖北 恩施, 445000; 4. 西南大学 水产系, 重庆 荣昌 402460)

摘要:对近年来发生在厦门海域的裸甲藻(*Gymnodinium*)和原甲藻(*Prorocentrum*)赤潮的发生情况进行了监测分析, 采用了采样、分离、单种培养、显微镜和扫描电镜观察、rDNA序列分析等系列监测、分离培养和赤潮生物鉴定技术, 重点观察并确证了厦门海域存在的赤潮原因种为微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)、*Takayama pulchellum*、无纹环沟藻(*Gyrodinium instriatum*)。光学显微镜观察表明, 赤潮发生海域存在着许多原甲藻和裸甲藻种类, 但不能进一步确认到种。利用电子显微镜观察, 可根据微小原甲藻体表规则的花纹等特征, 根据*Takayama pulchellum*具有明显的特异性反S形顶沟等特征分别对它们进行有效地分类鉴定。分子分类学分析表明, *T. pulchellum* (株名为TPXM) 28S rDNA D1-D2区序列长度为721 bp, 与基因库中同种相似株的同源性大于99%; 微小原甲藻(株名PMDH)的ITS和28S rDNA序列与基因库中同种序列的同源性高达99%; 无纹环沟藻(株名GIXM)的ITS与基因库中登记的分离自中国深圳海域的4株同种藻的同源性也高达99%。用ITS序列和28S rDNA序列建立的系统进化树也能很好地显示微小原甲藻、*Takayama pulchellum*、无纹环沟藻之间以及它们与其他藻之间的亲缘关系。将上述结果结合文献记录和环境条件进行了分析, 证实这3种赤潮种类*Takayama pulchellum*、无纹环沟藻、微小原甲藻是厦门海域较为常见的赤潮原因种。对上述检测和鉴定方法的系统应用也表明, 这些方法可应用于对现场赤潮生物进行有效监测。[中国水产科学, 2007, 14(6): 950-960]

关键词:厦门西海域; 赤潮; *Takayama pulchellum*; 无纹环沟藻; 微小原甲藻

中图分类号: X173

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)06-0950-11

近年来, 赤潮的发生越来越频繁, 区域也不断扩大, 已经成为全球性的主要海洋灾害之一, 赤潮研究也成为当前海洋环境研究领域的热门课题。厦门西海域赤潮研究开始于国家“七五”发展计划时期, 该海域赤潮的发生原因复杂, 是环境污染、地理因素、气象因素和生物之间相互作用和生态适应等综合作用的结果^[1-2]。赤潮发生时, 复杂的群落结构、共存的多物种及其生理代谢物质给常规赤潮监测带来了很大困难。赤潮生物(藻)形态的相似性和复杂性让训练有素的分类学专家亦很难在短的时间内利用常规光学显微镜方法将其准确地鉴定到种或亚种水平。对赤潮生物鉴定不准确或鉴定错误将对赤潮防治和早期评估带来很大困难。因此, 开展海域典型赤潮原因种的检测(鉴定)和常规的监测、监视及相关方法的系统研究显得十分紧迫且非常必

要^[2]。厦门西海域属于赤潮多发水域, 有关赤潮动态、生消过程及其与其环境之间相互作用关系的跟踪研究已有许多报道^[1-3]。林金美^[4]、张水浸等^[3]报道了厦门附近海域有浮游甲藻约50余种。林元烧等^[5]首次报道了厦门海域出现微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*), 是该种在中国沿海的首次记录。方琦等^[6]在厦门湾沉积物中发现13种甲藻孢囊, 其中有毒和有害种各2种。顾海峰等^[7]对塔玛亚历山大藻(*A. tamarense*)和链状亚历山大藻(*A. catenella*)休眠孢囊的分布及萌发进行了研究。林元烧^[8]首次报道了在厦门地区的海域中存在着塔玛亚历山大藻, 这些甲藻密度常常处于爆发赤潮的临界点上。蓝东兆等^[9]分析了厦门湾表层沉积物中甲藻休眠孢囊, 发现了1种有毒的塔玛亚历山大藻休眠孢囊。林金美^[4]报道了厦门海域甲藻的

收稿日期: 2007-05-08; 修订日期: 2007-07-05.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 973 项目 (CE0409704); 厦门市创新科技基金项目 (3502Z20041059); 中国博士后基金项目 (20060400854); 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室开放课题 (LFB20070611).

作者简介: 侯建军 (1966-), 男, 教授, 博士, 主要从事环境科学和分子生态学研究. E-mail: jjhou@mail.hzau.edu.cn

通讯作者: 黄邦钦, 男, 教授, 博导, 主要从事海洋生态学研究. E-mail: bqHuang@xmu.edu.cn

分布情况,结果显示海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)为优势种类。国家海洋局已确定将厦门近岸海域作为国家级的赤潮监控区,持续开展了高频率、高密度的定点定时监视、跟踪监测,掌握了海域内赤潮的发生动态,对已发生的赤潮进行发展趋势预测,为赤潮防灾减灾提供了决策性依据^[2]。我们在近几年也对厦门海域经常发生赤潮的区域进行了常规监测采样工作,跟踪和记录了2003、2004、2005年夏季发生在厦门西海域的赤潮情况,采集了部分赤潮样品,并重点观测了其间发生的裸甲藻(*Gymnodinium*)和原甲藻(*Prorocentrum*)赤潮,旨在为赤潮监测及减灾防灾提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 采样时间与站位设置

分别在2004年和2005年,对厦门海域进行周年采样,同时也根据这些海域赤潮发生的客观情况,实时地安排一些现场样品的采集。具体的采样测站详见图1。

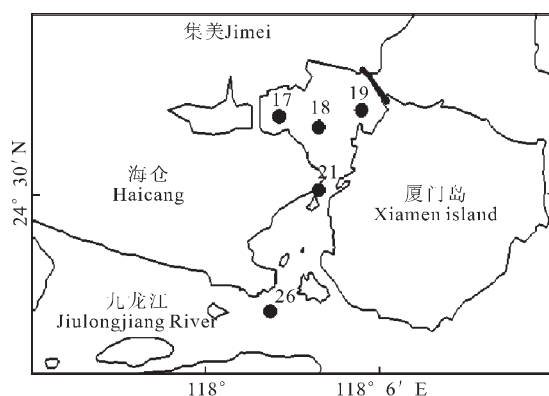


图1 采样测站设置

Fig.1 Diagram of sampling stations

1.2 样品采集

现场样品采集及固定方法:用采水器采集5~10 L表层海水,用10 μm 筛绢过滤浓缩,将海水体积浓缩为100~200 mL;估计其体积,根据样品研究的需要分别加入1/10体积的多聚甲醛(10%),终质量分数为1%;或相应采用1%的鲁格氏碘液、4%的福尔马林、2.5%戊二醛进行固定,进行显微镜初检,测定藻细胞大小,选择适当的放大倍数和视野拍照保存。

1.3 样品分离

采用毛细玻璃管或10 μL 的微量加样器在新鲜采集、未固定的样品中于体视显微镜下挑取单种藻的单细胞多个,根据实际情况可以先采用筛绢预过滤或加入f/2培养基预培养,置于多孔细胞培养板中,镜检观察并加入f/2培养基持续培养,逐步经过多次挑取和驯化培养后,待细胞长至一定密度时,可转移至培养瓶中正常培养。

1.4 样品培养

将已经分离出来,并能正常生长的单种赤潮藻用0.45 μm 滤膜过滤的海水煮沸后配成f/2培养基,在126 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的光强,L:D=12:12的光周期和22℃的温度条件下进行单种培养^[10]。

1.5 细胞计数

参照侯建军等^[11]的方法,库尔特计数器为美国Beckman公司的MultisizerTM3 Coulter counter,采用100 μm 的测定管,标准测定范围为1.4~42 μm 。用于校正的显微镜为Zeiss Axioskop多功能显微镜。

1.6 电镜观察

取固定的样品10 mL,用针筒过滤器过滤在2 μm 的核孔膜(Millipore)上,用PBS洗涤3~4次,再顺序用15%、20%、30%、40%、50%、60%、80%、100%的乙醇梯度脱水(乙醇的梯度不可太大,逐级脱水10~15 min),最后两个梯度重复脱水2次,整个过程都要避免藻体暴露于空气中。然后以100%乙醇:100%乙酸异戊酯=1:1(V:V)及100%的乙酸异戊酯进行置换30 min,保存在100%的乙酸异戊酯中。仪器为XL-30环境扫描电子显微镜(FEI公司),带有Peltier冷台。样品台温度调节范围4~5℃,电压:15.0 kV(根据实际情况实时调整),样品室气压调节范围 $0.13 \times 10^2 \sim 7.33 \times 10^2 \text{ Pa}$,样品室的湿度为75%~80%。

1.7 分子生物学分析

赤潮藻rDNA的PCR、克隆、测序等分子鉴定程序按照本实验室以前的研究方法进行。用于扩增rDNA引物有5对(ITS 1对、28SrRNA 1对、18SrRNA 3对)^[12]。根据Adachi等^[13]的方法分析各序列结构,用Clustal X1.81和Primer 5.1等软件对拼接处理后的序列进行比较分析。使用BlastN search (www.ncbi.nlm.nih.gov)将所测序列与NCBI数据库中的序列进行比对,从而获得目标藻与GenBank数据库序列的相似性信息^[13]。对各序列及其所属藻株进行细致的描述和分类界定,在

GenBank 中对得到的序列进行登记注册;最后用 Vector NTI Suite 9 软件下载和管理所需序列,并进行初步比对以及多重完全比对,采用邻位连接法 (Neighbour-Joining method) 构建系统进化树,并通过自举分析 (bootstrap) 作置信度检测,自举数据集为 1000 次。所获得的分支树用 Treeview1.5.2 程序分析处理。

2 结果与分析

2.1 采样测站的设置及赤潮发生与分布情况

根据图 1 所示采样测站,在对厦门海域进行周年例行的季度监测采样过程中,于 2004 年 5 月 20 日、2004 年 6 月 8 日连续 2 次偶然观察到大型的裸甲藻赤潮。2004 年 5 月 20 日在图 1 的 26 号测站(九龙江口一带)观察到裸甲藻赤潮带,其面积大约为 $2\text{ km} \times 6\text{ km}$,镜检密度为 $5.97 \times 10^6\text{ cell/L}$ 。当时气候为阴雨天气,时间为下午 2 时左右。2004 年 6 月 8 日,在厦门西海域采样时,发现整个西海域(17、18、19、21 等测站)也出现较大面积的裸甲藻赤潮,已处于赤潮的消退期。镜检密度为 $2.46 \times 10^6\text{ cell/L}$ 。两次赤潮的藻体大量聚集时,水体呈褐色。在 2005 年的春、夏季进行观测、采样时,也在多个测站发现了裸甲藻 (*Gymnodinium*) 和原甲藻 (*Prorocentrum*)。虽然当时这些裸甲藻和原甲藻尚未形成赤潮规模,但在这些观测位置已具有相对较高的藻细胞密度。在 2003 年夏季,国家海洋局第三研究所的顾海峰博士也观察到厦门海域有多种裸甲藻赤潮种类出现,见图 2-Q~X(顾海峰,私人交流)。经与图 2-A~P 及相关文献比较,上述裸甲藻的赤潮中有 1~2 种为近几年来厦门海域经常发生的赤潮种类。

2.2 目标赤潮生物细胞的形态及数量观察

对赤潮水样中的目标藻类进行光学显微镜初步观察和鉴定,表明样品中优势赤潮生物为甲藻门中的裸甲藻 (*Gymnodinium*)。2004 年 5 月、6 月两次赤潮的密度均较高,属单相型裸甲藻赤潮。单从形态上暂时无法定到具体种。根据大小和形态观察,赤潮中大约有 2~3 种裸甲藻种类出现,图 2 的 G、H、O、P 为优势种。藻体营游泳单细胞生活,其大小为 $25\text{ }\mu\text{m} \times 23\text{ }\mu\text{m}$,平均为 $23\text{ }\mu\text{m}$ 。其基本的形态特征如照片所示:藻体上、下锥体部分明,中间的横沟右旋,腹部的纵沟贯穿整个下锥部,上锥部为半球形

或圆锥形,下锥部的底部中央有明显的凹陷。光学显微镜下只能看到背腹面,较难看到侧面或顶底面。横沟和纵沟处各有一条鞭毛,并借助鞭毛呈摇摆旋转向前运动;藻体为黄褐色。图 2-A~F, I~N, Q~S 的特征为:单细胞藻体,运动方式为旋转向前游动。细胞长 $30 \sim 50\text{ }\mu\text{m}$,宽 $20 \sim 40\text{ }\mu\text{m}$;细胞背腹略呈扁平状,横沟沟缘向外隆起,使横沟以下部分的腹面呈内凹状;上锥部为明显的平顶山峰状;横沟左旋。在赤潮监测采样中也发现了原甲藻。其光镜下的特征为:藻体壳面观呈心形或卵形,体长为 $15 \sim 23\text{ }\mu\text{m}$,宽度为 $13 \sim 17\text{ }\mu\text{m}$ 。顶刺短小,叉状,顶生,副刺短。两壳板表面布满突起的小刺,壳板表面稀疏分布着刺丝胞孔(见图 2-Y~Z;图 3-B)。

2.3 厦门海域典型赤潮原因种的扫描电镜 (SEM) 观察

在优化的固定和脱水处理方法以及优化的 SEM 观测条件下,对实验室单种培养的 *T. pulchellum* 和 *P. minimum* 进行 SEM 观察。结果表明, *T. pulchellum* 的形态饱满,纹理清晰,结构完整。从图 3 可以看出, *T. pulchellum* 的上下锥体分明,纵鞭毛(图 3A)、中间右旋的横沟(图 3B)、顶部有明显的特征性反“S”形顶沟(图 3C)和腰鞭毛(图 3G)。此外还可见顶突(图 3D)、横沟和顶沟中的带状物(图 3E)及藻体线纹(图 3F)。图 3 很好地显示了 *T. pulchellum* 完整的外形特征。微小原甲藻的电镜观察比较容易,外形特征很清楚,其电镜观察效果见图 3。经与 Larsen 描述的模式种比较分析,本研究观察到藻株部分细胞的横沟也出现偏移现象;另外根据本株细胞的形态、大小和明显的特征性反 S 形顶沟等特征,这些直观依据可以帮助我们初步认定本株裸甲藻为 *T. pulchellum* (株名 TPXM)。另外,微小原甲藻的特征较为明显,电镜观察发现细胞表面有微小原甲藻典型的规则花纹(图 3-H);细胞大小为长 $22.0\text{ }\mu\text{m}$,宽 $6.4\text{ }\mu\text{m}$;细胞正面观呈心形或卵形,侧面观呈透镜形,细胞后端通常为椭圆形,前端有一轻微凹陷。由于其在光镜下的特征也比较突出,因此可以确认为微小原甲藻 (*P. minimum*, 株名 PMXM)。另外一株裸甲藻样的赤潮生物 *Gyrodinium* (株名 GIXM) 因其细胞较大,光镜下特征就很突出,结合后述分子生物学分析的依据,无需做电镜分析,便可以确认其为无纹环沟藻 (*G. instriatum*, 株名 GIXM)。

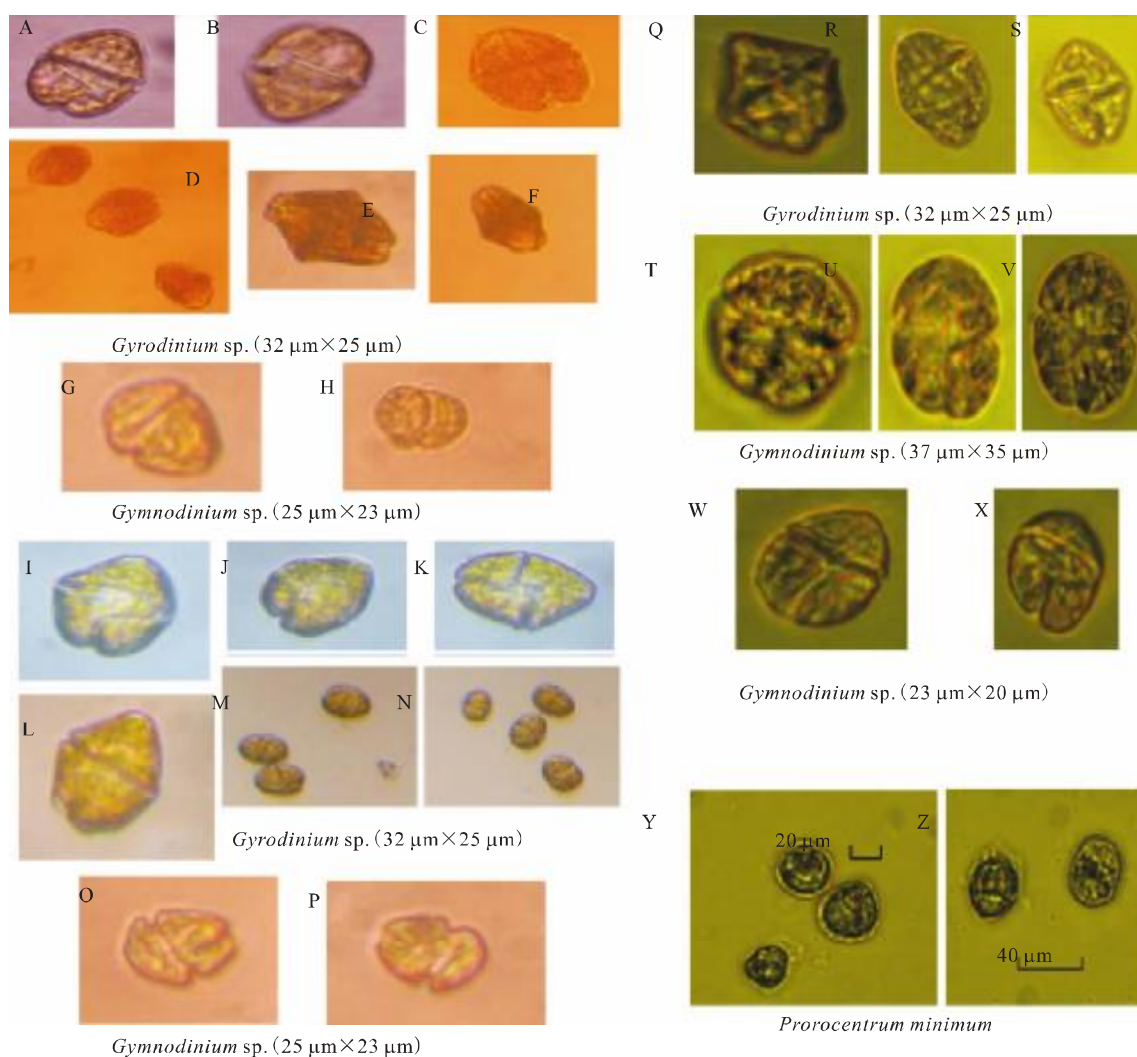


图2 近几年厦门港赤潮水样中裸甲藻和微小原甲藻的显微镜照片

注: A~H: 2004年05月20日厦门港裸甲藻赤潮的显微镜图片; I~P: 2004年06月06日厦门港裸甲藻赤潮的显微镜图片; Q~X: 2003年厦门港发生裸甲藻赤潮的显微镜图片(顾海峰, 私人交流). Y~Z: 2004年厦门港的微小原甲藻照片.

Fig.2 The pictures of microscope showing the *Gymnodinium* and *Prorocentrum* in the samples from Xiamen Harbor during recent years

Note: A-H: Microscopic pictures of *Gymnodinium* from Xiamen Harbor on 20th, May, 2004; I-P: Microscopic pictures of *Gymnodinium* from Xiamen Harbor on 6th, June, 2004; Q-X: Microscopic pictures of *Gymnodinium* from Xiamen Harbor in 2003 (GU Hai-feng, private correspondence); Y-Z: Microscopic pictures of *Prorocentrum minimum* from Xiamen Harbor in 2004.

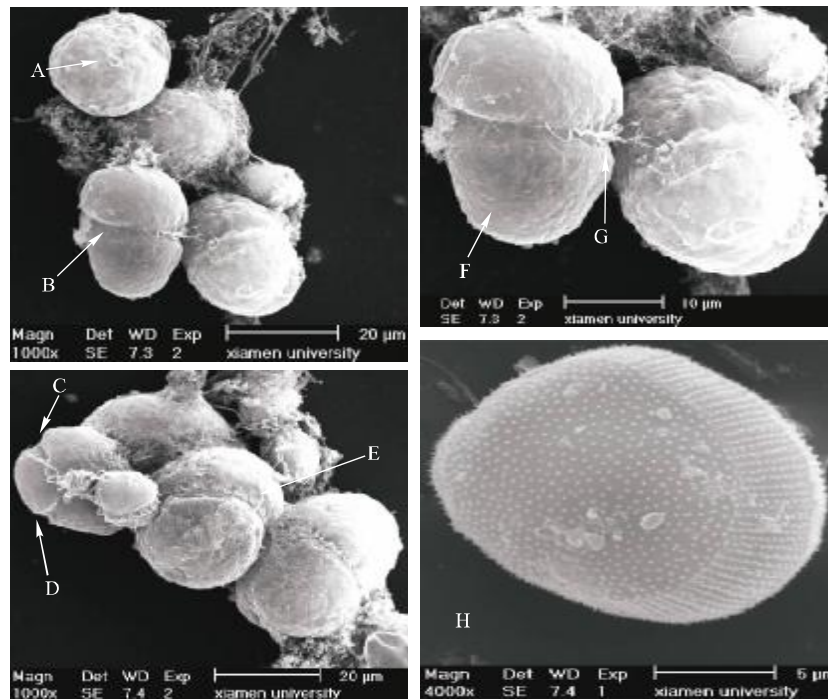


图3 *Takayama pulchellum* 和 *Prorocentrum minimum* 的扫描电镜观察

A: 纵鞭毛; B: 横沟; C: 顶沟; D: 顶突; E: 带状物; F: 藻体线纹; G: 腰鞭毛; H: 微小原甲藻。

Fig.3 Pictures of SEM showing fine morphological characteristics of *Takayama pulchellum* and *Prorocentrum minimum*

A: longitudinal flagella; B: transverse groove; C: apical groove; D: apical carina; E: cingulum; F: spiral marking; G: transverse flagella; H: *Prorocentrum minimum*.

2.4 几株重要赤潮藻种的单种分离培养及分子生物学分析

根据方法 1.2、1.3、1.4, 从厦门海域的赤潮样品中分离得到 3 株赤潮藻种, 在实验室用 f/2 培养基进行单种培养。其中藻种 1 为图 2 的 A~F, I~N, Q~S, 藻种 2 为图 2 的 G、H、O、P, 藻种 3 为图 2 的 Y~Z。经显微镜观察初步确定为裸甲藻 (*Gymnodinium* sp.), 环沟藻 (*Gyrodinium* sp.) 和原甲藻 (*Prorocentrum* sp.)。然后对这些单种培养藻的 rDNA 进行了 PCR 扩增、克隆、测序, 对测序结果和长度进行了分析, 对分离培养的目标藻进行了初步的分子生物学分析及分子鉴定。获得的序列公布于 GenBank, 这些藻的具体信息如下:

藻种 1 为无纹环沟藻 (*Gyrodinium instriatum*, Freudenthal et al. 1963)。在 GenBank 中公布的 rDNA 序列 (包括 ITS、18S、28S) 分别为:

DQ084523: *Gyrodinium instriatum* strain GIXM internal transcribed spacer 1, partial sequence;

5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. gi | 68137970 | gb |; ITS1, 5.8S, ITS2 的长度分布为 234 bp、158 bp、211 bp。

DQ084523.1 | [68137970]; DQ084522: *Gyrodinium instriatum* strain GIXM 18S ribosomal RNA gene, partial sequence. gi | 68137969 | gb | DQ084522.1 | [68137969]; 长度为: 1 800 bp。

DQ084521: *Gyrodinium instriatum* strain GIXM large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. gi | 68137968 | gb | DQ084521.1 | [68137968]; 其序列长度为: 889 bp。

藻种 2 为 *Takayama pulchellum* (国家海洋局第三研究所顾海峰鉴定, 私人通信, 公开发表的数据见文献^[14]), 我们在 GenBank 中公布该种的 18S rDNA 序列为:

AY800130: *Takayama* cf. *pulchellum* (TPXM) 18S ribosomal RNA gene, complete sequence. gi |

55847486 | gb | AY800130.1 | [55847486]; 长度为 1 799 bp。

藻种 3 为: 微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller 1933)。我们在 GenBank 中公布的其 rDNA 序列 (包括 28S、ITS、18S) 分别为:

DQ054539: *Prorocentrum minimum* strain PMDH large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. gi | 66356312 | gb | DQ054539.1 | [66356312]; 871 bp。

DQ054538: *Prorocentrum minimum* strain PMDH 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. gi | 66356311 | gb | DQ054538.1 | [66356311]; ITS1, 5.8S, ITS2 的大小分别为: 205 bp、158 bp、189 bp。

DQ028763: *Prorocentrum minimum* strain PMDH 18S ribosomal RNA gene, complete sequence. gi | 66356306 | gb | DQ028763.1 | [66356306]; 其长度为: 1 796 bp。

对获得序列的结构进行分析表明, 这些序列覆盖了 SSU rDNA (核糖体小亚基) 基因的 3' 端绝大部分序列甚至全长、ITS1 (转录间隔区 1)、5.8S rDNA 及 ITS2 区域的全长序列以及 LSU rDNA (核糖体大亚基) 基因的部分序列。根据对各区域的详细分布及其与近缘种相似序列进行具体比较和同源性分析表明: *Takayama pulchellum* (TPXM) 18S rRNA 序列在 GenBank 中和 *Karlodinium micrum* (AY245692) 以及几株 *Gymnodinium galatheanum* (AF272045~272050) 等裸甲藻种类的同源性均达到 98%, 表明 18S rRNA 序列在这些裸甲藻种类中较为保守; 而 ITS 序列与基因库中登录号为 QQ459434 的 *Karlodinium micrum* 同源性为 92%, Gaps 占 1%, 与其他株差异更大, 表明 ITS 序列变异性较大, 可用来构建较为准确的系统进化树或设计检测探针; *T. pulchellum* LSU D1-D2 区序列长度为 721 bp, 与基因库中同种相似株的同源性大于 99%, 由此证明分离得到的这株藻为 *T. pulchellum*。微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum*, PMDH)、无纹环沟藻 (*Gyrodinium instria-*

tum, GIXM) 的 18S rRNA 序列与基因库中同种以及不同种序列的同源性均很高, 为 99%。18S rRNA 较为保守, 不能有效区分近源种。微小原甲藻 PMDH 株的 ITS 和 28S rRNA 序列与基因库中同种序列的同源性高达 99%, 证实所分离到的藻为微小原甲藻。这些序列与其他藻种的相应序列存在较大差异。无纹环沟藻 GIXM 株的 ITS 与基因库中登记的分离自中国深圳海域的 4 株同种藻的同源性高达 99%, 也证实本研究分离得到的是无纹环沟藻。但其 28S rRNA 序列与基因库中的 *Gymnodinium* sp. (AY916549) 和 *Gyrodinium uncatenum* (AY916541) 的同源性分别为 100% 和 100%, 提示用无纹环沟藻 GIXM 的 28S rRNA 这段序列不足以区分其他种类, 或者基因库中这些登记的序列有误。

由 ITS 序列构建的系统进化树 (图 4) 分析表明, *T. pulchellum* (AY764179) 和 *Karlodinium micrum* AY245692 的距离最近; 同时和 *Karenia* (AF318225) 及 *Gymnodinium* (AF318247) 这两株藻也有较近的亲缘关系; 目标生物微小原甲藻 (DQ054538) 和东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 的亲缘关系很近; 厦门海域的无纹环沟藻 GIXM (DQ084523) 和分离自深圳海域的另一株 *Gyrodinium* (AJ534386) 的关系很近, 无纹环沟藻与 *Gymnodinium* sp. 和 *Akashiwo* 属的亲缘关系也相对较近。用大亚基构建的系统进化树分析显示, *Takayama* 属的 3 种藻株形成亲缘关系很近的一支, 并与 *Karlodinium* 属的 2 株藻距离较近, 与 *Karenia* 属也较近。目标生物无纹环沟藻 (DQ084521) 距离 *Gymnodinium* 属和 *Akashiwo* 属相对较近。*Prorocentrum* 的 7 种藻株形成了亲缘关系很近的一个簇, 目标生物微小原甲藻和基因库中一株 *P. balticum* (AF042816) 的亲缘关系极近。由核糖体小亚基构建的系统进化树可见, 目标生物 *T. pulchellum* 和 *Karlodinium* sp. 和 *G. galatheanum* 距离较近, 与大亚基构成的进化树关系类似; 目标生物无纹环沟藻与同种或相近种也能构成亲缘关系很近的一支, 与其他藻的关系则较远; 5 种 *Prorocentrum* 属藻类也形成亲缘关系很近的一支进化树, 但其与 *T. pulchellum* 所在的进化树距离也很近, 显示用核糖体小亚基构建的系统进化树不能精确区分这些赤潮生物 (图 4)。

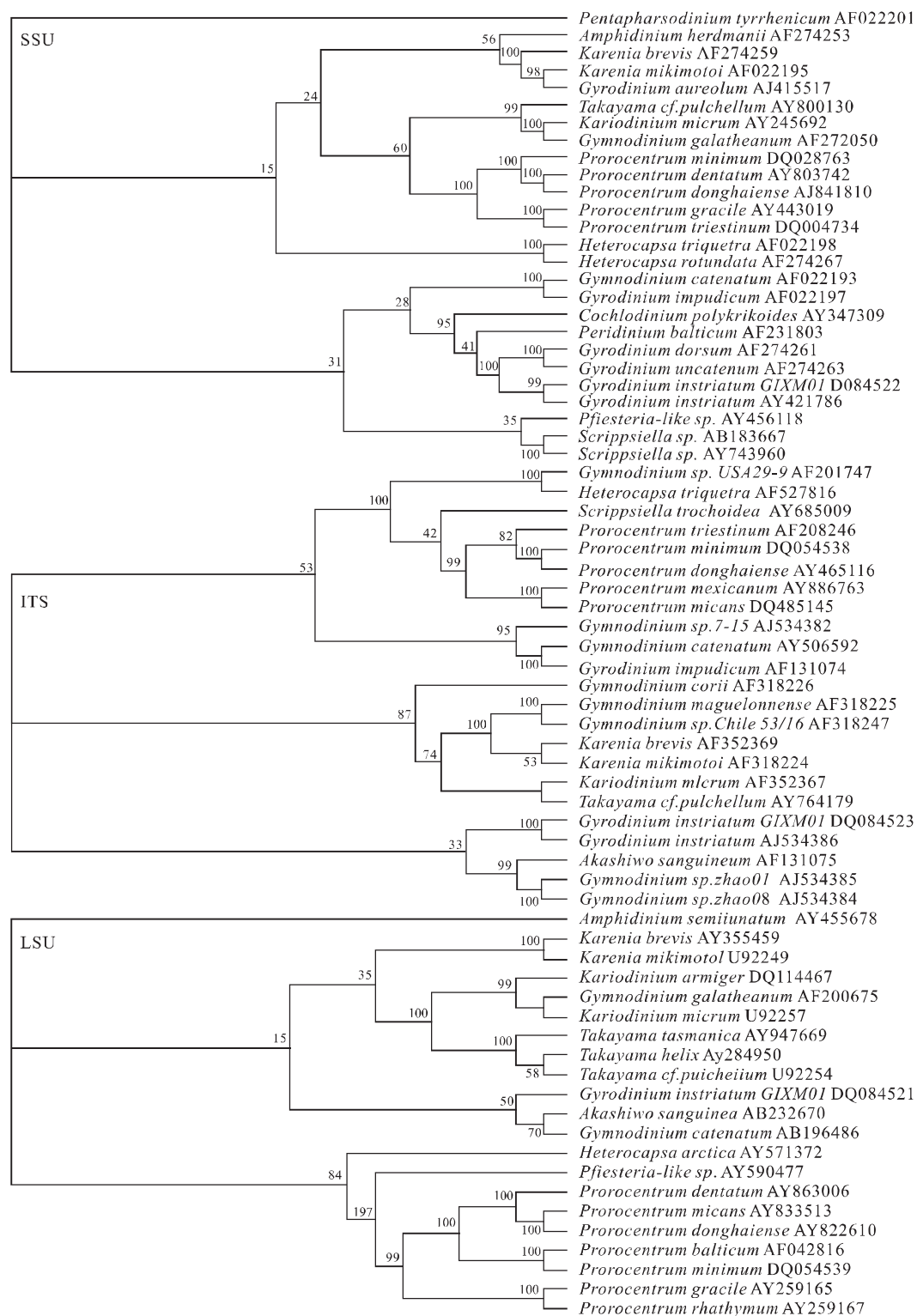


图 4 用邻位连接法建立基于 rDNA 序列的系统发育树

注: 节点上的数值为自举检测的置信度。

Fig. 4 Neighbor-Joining method consensus tree resolved from rDNA nucleotide sequence

Note: Numbers next to the nodes of the tree indicate statistical support of 1 000 bootstraps.

3 讨论

3.1 厦门西海域的赤潮原因种及其发生状况

经过 2003、2004、2005 年连续 3 年的观察和样品分析,发现厦门西海域的裸甲藻赤潮经常发生。在 2004 年的采样观察中,5 月 20 日的裸甲藻赤潮密度达到 5.97×10^6 cell/L;2004 年 6 月 8 日西海域裸甲藻赤潮密度为 2.46×10^6 cell/L。按照日本赤潮专家安达六郎的意见^[3],若赤潮生物细胞大小在 $10 \sim 29 \mu\text{m}$,其细胞密度达到 1×10^6 cell/L 以上,则视为发生赤潮。有些赤潮种类还有待进一步进行鉴定。本研究在 2004 年,顾海峰等^[14]在 2003 年相继在厦门西海域发生的赤潮水样中分离培养了新记录的一种裸甲藻。通过光学显微镜、扫描电镜的形态观察和 rDNA 序列分析,基本确定其为 *T. pulchellum*,该株系被命名为 TPXM。我们还采用 Lectin 探针和针对 *T. pulchellum* 设计的 DNA 探针及 PNA (肽核酸) 探针针对 2005 年的赤潮样品进行了检测和验证,结果也表明 2005 年厦门西海域在多个测站都出现 *T. pulchellum* (未发表数据)。根据先前的文献记载,张水浸等^[3]也对厦门西港区的 1 次裸甲藻赤潮进行了细致的跟踪观察和记录,根据其基本特征及其与生境的相互关系,推测当年发生的赤潮也极有可能是 *T. pulchellum*。上述所有结果均表明 *T. pulchellum* 为厦门海域的常见赤潮种类。当然,厦门海域其他的裸甲藻种类也很常见。郭丰等^[15]对厦门潘涂对虾养殖垦区浮游植物的生态特征进行调查表明,常年可见简单裸甲藻 (*Gymnodinium simplex*)、微小原甲藻 (*P. minimum*)、锥状斯氏藻 (*Scrippsiella trochoidea*) 和 *Gyrodinium pel-lucidum*,以及少数直径小于 $15 \mu\text{m}$ 的裸甲藻 (因其细胞易破裂和变形,当时未能鉴定到种)。我们也从厦门海域的赤潮水样中分离和培养了无纹环沟藻 (*Gyrodinium instriatum*),并对其 18S rDNA、ITS 和 28S rDNA 的序列进行了 PCR 扩增、克隆和测序鉴定工作。厦门海域的原甲藻和裸甲藻均为常见的赤潮原因种。林金美^[4]报道了厦门海域甲藻的分布,结果显示海洋原甲藻 (*Prorocentrum micans*) 为优势种类。

3.2 厦门海域裸甲藻和原甲藻赤潮发生的可能原因分析

厦门西海域赤潮发生的原因复杂,主要是环境污染、地理历史因素、气象条件与浮游生物生态适应

性等综合因素作用的结果^[2-3]。厦门西港海区的有机污染和富营养化严重,是赤潮发生发展的物质基础^[1-2]。该港区形似倒置烧瓶,腹大口狭,水体交换条件差。筼筹湖、马銮湾、杏林工业区和湖里加工区的排污更加重了污染。港区的形态特征和污染物的长期积累,为赤潮的发生创造了良好的环境^[3],同时气候和水文因素也是厦门海域裸甲藻赤潮发生的重要原因。本研究观察到的两次裸甲藻赤潮发生时正值雨季,引起气温和水温发生变化,雨水引起海水盐度降低。这些环境因素变化与海区中浮游甲藻种类的数量分布和季节演替直接相关。其中的水温和盐度更为重要,温度影响海洋生物的代谢作用和繁殖节律;降雨产生的径流也带来了肥料及土壤浸出液,其中富含磷、铁、锰、维生素、有机螯合物、动物组织等,这些因素均为裸甲藻赤潮的发生创造了较好的条件^[1,3]。

除了港区的地质、水文条件和生活污水引起水体富营养化这些通常引起赤潮频发的重要原因外^[2],也与厦门作为国际货运港口、有着较长的国际航运历史等原因有关。Hallegraeff 等^[16-17]认为甲藻休眠孢囊的传播途径主要是压舱水排放和贝类引种。据估计,1 个压水舱可以携带 3 亿个甲藻孢囊。1991 年至 1993 年,对福建省一些海域甲藻休眠孢囊进行调查的结果表明,这些海域甲藻种类已有明显的增长,原因可能就与压舱水排放和贝类引种有关。总之,上述原因均为外来有毒甲藻传播创造了客观条件^[6,9]。

3.3 本监测方法的优点、特色及可靠性和可行性分析

在赤潮生物的检测、监视和鉴定工作中,基本的研究内容和观测指标主要如下:1) 赤潮生物的生物量监测,包括基于细胞计数、叶绿素测定和光合色素分析技术^[10-11,18];2) 对赤潮生物的形态观察,包括光学显微镜观察、扫描电镜 (Scanning electron microscope, SEM) (含环境扫描电镜技术) 和透射电镜观察技术^[19];3) 赤潮生物的分离、纯化培养技术;4) 分子鉴定技术,包括 DNA 的提取、PCR、克隆、测序及序列分析等^[12,20-21]。根据上述内容,本研究也建立了现场赤潮监测采样、样品固定处理、显微镜观察、现场样品中目标赤潮生物分离、单种培养以及扫描电镜观察、DNA 提取、PCR、克隆、测序、序列分析等种类鉴定的一整套组合技术方案。

所使用的监测、鉴定方法单独使用时都各有其

优缺点。这是由于赤潮藻形态的相似性和复杂性,即使是训练有素的分类学专家亦很难在光学显微镜下将赤潮藻准确地鉴定到种或亚种水平,基于光学显微镜的常规方法也难于分辨形态学相似但生理功能不同的种类,需要进一步借助电镜的高分辨率和高精确度。比如裸甲藻因缺少有效的分类依据,最近的研究就借助电镜观察的结果,根据 *Takayama* 属的 S 形顶沟,将其从裸甲藻属中分离出来^[14]。本研究结果也证实了这点。然而电镜方法耗时昂贵,同时也要求鉴定者具有丰富的经验和分类知识。无论是电镜还是显微镜等传统分类方法均需花费较多的时间和精力。虽然传统分类手段在相当长的一段时间内,对浮游植物尤其是赤潮生物的分类鉴定方面起到了重要的作用,但传统的形态学分类手段总是有限的,导致分类模糊、种类界限不清的情况时常发生。形态相似的物种并不意味着其遗传起源相同,形态上存在差异也并非表明其遗传上没有关系。所以需要考虑发展新的分子分类技术去鉴定和识别这些疑似赤潮藻^[22]。分子分类法提供了以 DNA 序列或蛋白质及氨基酸序列的变异及差异为基础的客观标准,可以消除传统的形态分类遇到外表细微差异的情况时,必须依赖主观判别而造成的困扰^[23]。分子分类学标记因其对于细胞生长具有独特功能而显示出其重要性和特异性。但分子手段也存在局限性,比如受 GeneBank 中序列的准确性、数据库序列数量等限制;同时分子分类手段也不能完全取代常规的显微镜检测方法 (Anderson, 私人交流)。另外,现场赤潮种类组成过于复杂,所以单种分离、纯化培养对于赤潮生物的准确鉴定、生理特性研究、分子生物学分析以及分子探针的设计具有重要的意义;同时,对赤潮细胞的计数监测技术进行改进也十分重要^[11]。上述方法单用时,效果要差很多;集合使用并进行优化才会产生较好的效益。一个好的检测、鉴定方法要求系统、准确、全面,检测结果能相互印证,通过简单的培训就能为环境监测机构的人员所应用,同时也要求相对简便、程序化的检测方法和设备及较低的运行成本。本检测方法兼有传统检测方法直观方便的优势,必要时又可采用优化的电子显微镜鉴定方法,精度高;又集中了先进的分子分析等鉴定手段的准确、全面和可靠性特点,在此基础上可设计分子探针,并能提供定量的检测信息,可以检测较低丰度的目标赤潮藻种^[22-24]。所以上述方法结合使用,不仅能很好地进行单种样品的检测分析,

也能有效地用于对现场样品的监测监视,使之能在常规监测工作中使用。可见本方法的特色和优势十分明显。

经过现场的实际监测应用表明,本研究的整套方法可行可靠,集成起来使用操作相对简便。其中 DNA 提取、PCR、克隆、测序的优化方法参见作者之前的文章^[12]。在藻种分离和纯化培养中,采用营养加富、密度梯度稀释、用微量加样器 (10 μ L) 或毛细玻璃管于体视显微镜下挑取并逐步稀释,用不同的光照和营养条件进行驯化培养的方法,能较好的对目标赤潮生物进行分离培养。当然,也有相当一部分种类暂时还不能有效地实现分离和单种培养,有关方法尚需要进行优化。在分类分析和种类鉴定方面,我们在单种分离培养的基础上,结合显微镜、电镜和 DNA 序列分析、色素分析^[10]等鉴定技术能较为可行地对现场的赤潮原因种进行有效地监测和鉴定。监测应用结果表明,上述的方法体系在实际应用中较为可行,获取的数据也比较可靠,能较好地现场赤潮发生情况进行监测。

致谢:国家海洋局第三海洋研究所顾海峰博士进行了 *Takayama pulchellum* (TPXM) 的鉴定工作并提供了部分资料,项目合作单位厦门海洋环境监测中心站提供了部分厦门海域赤潮监测的背景数据和采样协助,厦门大学纳米科技中心协助进行了电镜观察,谨此致谢。

参考文献:

- [1] 陈慈美,张采云,吴瑜端,等.养殖污水对厦门西港富营养化/赤潮效应 II:生命要素内循环动力学过程研究 [C]//中国赤潮研究. SCOR-IOC 赤潮工作会议论文集. 青岛:青岛出版社,1996,108-115.
- [2] 许珠华,侯建军.福建沿海赤潮的发生特点及防治措施 [J]. 台湾海峡,2006,25 (1):143-149.
- [3] 张水浸,许昆灿,陈其焕,等.厦门西港区一次赤潮的观测 [J]. 海洋学报,1988,10 (5):602-608.
- [4] 林金美.厦门西海域浮游植物的生态 [J]. 台湾海峡,1991,10 (4):345-350.
- [5] 林元烧,曹文清,Sameer T,等.厦门西港甲藻孢囊种类和数量分布特征 [J]. 海洋与湖沼,2002,33 (4):407-414.
- [6] 方琦,蓝东兆,顾海峰,等.厦门湾沉积物中甲藻孢囊的初步研究 [J]. 水产学报,2003,27 (2):137-142.
- [7] 顾海峰,蓝东兆,方琦,等.我国东南沿海亚历山大藻休眠孢囊的分布和萌发研究 [J]. 应用生态学报,2003,14 (7):1 147-1 150.
- [8] 林元烧.有毒甲藻-塔玛亚历山大藻在厦门地区虾塘引起赤潮 [J]. 台湾海峡,1996,15 (1):16-18.

- [9] 蓝东兆, 方琦, 顾海峰, 等. 厦门湾沉积物中有害有毒甲藻休眠孢囊及塔玛亚历山大藻的潜在危害[J]. 台湾海峡, 2004, 23(4): 453–458.
- [10] Hou J J, Huang B Q, Cao Z R, et al. Effects of nutrient limitation on photopigments in *Thalassiosira weissflogii* and *Prorocentrum donghaiense* [J]. J Integr Plant Biol, 2007, 49(5): 686–697.
- [11] 侯建军, 黄邦钦, 戴相辉. 赤潮藻细胞计数方法的比较研究[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(8): 907–908.
- [12] 侯建军, 赖红艳, 黄邦钦. 用 PCR 扩增裸甲藻和微小原甲藻 rRNA 基因的方法研究[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2005, 23(1): 82–85.
- [13] Adachi M, Sako Y, Ishida Y, et al. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae) [J]. J Phycol, 1994, 30: 857–863.
- [14] 顾海峰, 孙军, 邹迎麟, 等. 厦门港纤小裸甲藻 (*Takayama pulchellum*) 的形态、生长及分子特征[J]. 生态学报, 2006, 26(4): 1021–1027.
- [15] 郭丰, 林均民, 黄凌风, 等. 厦门潘涂对虾养殖垦区浮游植物的生态特征[J]. 台湾海峡, 2002, 21(4): 469–482.
- [16] Hallegraeff G M, Bolch C J, Blackburn S I, et al. Species of the toxigenic dinoflagellate genus *Alexandrium* in southeastern Australian waters [J]. Botanica Marina, 1991, 34: 575–587.
- [17] Hallegraeff G M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase [J]. Phycologia, 1993, 32: 79–99.
- [18] 米铁柱, 甄毓, 于志刚, 等. 海洋浮游藻类检测技术发展及展望[J]. 高技术通讯, 2003, 13: 96–100.
- [19] Truby E W. Preparation of single-celled marine Dinoflagellates for electron microscopy [J]. Microsc Res Technol, 1997, 36: 337–340.
- [20] Muller J, Friedl T, Hepperle D, et al. Distinction between multiple isolates of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) and testing for conspecificity using amplified fragment length polymorphism and its rDNA sequences [J]. J Phycol, 2005, 41(6): 1236–1247.
- [21] 苟万里, 孙军, 何闪英, 等. 几种角毛藻亲缘关系的分子生物学分析[J]. 高技术通讯, 2003, 13: 68–95.
- [22] 侯建军, 陈纪新, 黄邦钦. 赤潮生物检测的分子探针技术研究[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(9): 1127–1129.
- [23] Kawai H, Sasaki H, Maeba S. Morphology and molecular phylogeny of *Phaeostrophion irregulare* (Phaeophyceae) with a proposal for *Phaeostrophaceae* fam. nov., and a review of *Ishigeaceae* [J]. Phycologia, 2005, 44(2): 169–182.
- [24] Hou J J, Huang B Q. Development of PNA probe technology on detection of *Takayama pulchellum* [C] // Ho K. C., Lu S. H., Wang Y. Key research findings to harmful algal blooms in the South China Sea. Proceedings of the 3rd international conference on the prevention and management of harmful algal blooms in the South China Sea (HABSCS2006), Hongkong, 2006: 368–374.

Observation of harmful algal blooms caused by *Prorocentrum* and *Gymnodinium* species in the western Xiamen Harbour

HOU Jian-jun^{1,2,3}, HUANG Hui⁴, LEI Hong-ling³, LAI Hong-yan^{1,3}, HUANG Bang-qin²

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China; 4. Department of Fisheries, Southwest University, Rongchang 402460, China)

Abstract: Harmful algal blooms (HABs) is increasing globally, and HABs is one of the major disasters along the coast of Xiamen Harbour. Further investigations and researches on the main types of HABs and the algal species causing HAB in coast water of Xiamen Harbour should be made; the environmental monitoring networks and methods along the coast of Xiamen Harbour should be set up and consummated; science researches with local characteristics should be fully developed, and the exotic HAB species from the cabin seawater of foreign ships should also be studied. Aiming directly at rapid identification and regular monitoring of HABs species, this paper tried to develop essential methods of identifying and monitoring HABs species, and evaluated systemic methods for rapidly monitoring and classifying HABs species in morphology and molecular taxonomy. Meanwhile, series of studies were also undertaken to evaluate in the field and tried to find these important HABs causing species along the coast water of western Xiamen Harbour.

The harmful algal bloom events caused by *Prorocentrum* and *Gymnodinium* species in coast water of

western Xiamen Harbour were monitored during recent years. A series of detecting methods based on the analysis of environmental factors, sampling, cell isolation and unicellular culture of these HABs species, observation under microscope and scanning electron microscope (SEM), and sequence analysis of rDNA were used together to monitor and identify these harmful algae. The methods used for collecting samples and establishing specific HAB unicellular cultures were described in detail. Methods of SEM (scanning electron microscope) and ESEM (environmental scanning electron microscope) for *Gymnodinium* were developed and optimized. These important species that caused harmful algal bloom in Xiamen Harbour were observed and identified as *Takayama pulchellum* (strain name: TPXM), *Gyrodinium instriatum* (strain name: GIXM) and *Prorocentrum minimum* (strain name: PMXM). Algal morphology was observed under LM, and the results suggested that there were many *Prorocentrum* and *Gymnodinium* species in coast water of western Xiamen Harbour, and these species could not be identified as specific species under LM. Two strain of *Prorocentrum* and *Gymnodinium* were isolated during blooms in Xiamen Harbor and their morphology were observed under SEM. The results showed that there were regular patterns and other characteristics on *Prorocentrum* cells, which indicated that PMXM was *Prorocentrum minimum*, and cells of TPXM were broadly oval with a conspicuous and well-defined sigmoid apical groove present on the epitheca, and the apical groove was a characteristic reversed S-shape. These characteristics showed that TPXM was *Takayama pulchellum*. Molecular biological analyses of rDNA sequences of *Prorocentrum* and *Gymnodinium* showed that the D1-D2 region of partial LSU (large subunit) rDNA of *T. pulchellum* (TPXM) had 721bp and shared more than 99% similarity to the same species whose data was deposited in the GenBank, the ITS and D1-D2 region of partial LSU of *P. minimum* (PMXM) also shared more than 99% similarity to the same species in the GenBank, and ITS region of *G. instriatum* (GIXM) shared more than 99% similarity to the same species isolated from Shenzhen Bay in China and its sequences were deposited in the GenBank, too. The analysis of rDNA sequences and phylogenetic trees could be an appropriate taxonomic evidence, especially the length and whole sequences analysis of ITS and variable regions D1-D2 of 28S rDNA could be more reliable and could provide more exact taxonomic informations than other methods. The phylogenetic trees constructed from ITS and partial 28S rDNA could show the relationships of *T. pulchellum* (TPXM), *G. instriatum* (GIXM) and *P. minimum* (PMXM) and their correlative species, and could also separate these species from their disrelated species clearly. According to above results, the characteristics and causation of HABs in western Xiamen Harbour caused by the three species were discussed based on the analysis of related references and environmental conditions. All the results suggested that the three HABs causing species, such as *T. pulchellum* (TPXM), *G. instriatum* (GIXM), *P. minimum* (PMXM) were common HAB species in coast water of western Xiamen Harbour. The results of methodological application in field indicated that these methods and protocols might become useful, feasible and reliable tools to monitor *in situ* distribution of bloom-forming taxa, such as *Gymnodinium* and *Prorocentrum* in natural water. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 950–960]

Key words: western Xiamen Harbour; harmful algal bloom; *Takayama pulchellum* (TPXM); *Gyrodinium instriatum* (GIXM); *Prorocentrum minimum* (PMXM)

Corresponding author: HUANG Bang-qin. E-mail: bqHuang@xmu.edu.cn