

中国南海四种凯伦藻种间作用与溶血活性初步研究*

林雅柔¹ 岑竞仪¹ 王建艳² 梁芊艳¹ 吕颂辉¹

(1. 暨南大学 生命科学技术学院赤潮与海洋生物学研究中心 广州 510632;

2. 北京自然博物馆 科学研究部 北京 100010)

摘要 凯伦藻属种类广布于世界沿海海域甚至大洋, 属广域分布种。该属下多个种类曾在全球近岸海域暴发有毒有害赤潮, 造成巨大的经济损失, 其中不乏由多种凯伦藻同时混合形成赤潮的现象存在。在 2016 年香港海域的一次凯伦藻赤潮中, 本团队从赤潮海水中分离出了米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)、长沟凯伦藻(*K. longicanalis*)、鞍形凯伦藻(*K. selliformis*)和蝶形凯伦藻(*K. papilionacea*) 4 种凯伦藻。本研究以此 4 种凯伦藻进行单种藻及多种藻混合样品的培养和溶血活性研究, 以探究复合型凯伦藻的种间作用及溶血活性。结果表明, 4 种凯伦藻间存在种间相互作用, 长沟凯伦藻会促进蝶形凯伦藻的生长, 鞍形凯伦藻和米氏凯伦藻会抑制长沟凯伦藻生长。4 种凯伦藻对兔血红细胞均有明显溶血活性, 长沟凯伦藻溶血活性最强为 46.36%±1.02%。每种凯伦藻与其他凯伦藻混合培养 3 天后, 对兔血的溶血活性会明显增加, 其中含 4 种凯伦藻的混合组溶血活性最高, 为 57.05%±1.13%。

关键词 蝶形凯伦藻; 鞍形凯伦藻; 长沟凯伦藻; 米氏凯伦藻; 溶血活性; 有害赤潮

中图分类号 X55 **doi:** 10.11693/hyhz20200100002

凯伦藻属(*Karenia*)隶属于裸甲藻目(Gymnodiniales)凯伦藻科(Kareniaceae), 该属多个种类在世界范围内频繁暴发有毒有害赤潮, 备受各界关注(Brand *et al.*, 2012; 俞志明等, 2019; Li *et al.*, 2019)。凯伦藻属的种类大多具有毒性, 目前已报道的 12 种中有 10 种曾引发有毒有害赤潮, 灾害效应包括致使养殖鱼类和贝类等海洋生物死亡, 引起食用者产生腹泻、痉挛、麻痹昏迷或引起呼吸困难综合症等(Brand *et al.*, 2012)。凯伦藻可产短裸甲藻毒素(Brevetoxin)、溶血毒素(Hemotoxin)、细胞毒素(Cytotoxin)、环亚胺毒素(Gymnodimine)和鱼毒素等毒素(Baden *et al.*, 1979; Baden, 1989; Haywood *et al.*, 2004)。

短凯伦藻(*Karenia brevis*)和米氏凯伦藻(*K. mikimotoi*)是凯伦藻属下最早也是受关注最多的两个种类。资料显示, 1946—1947 年在美国佛罗里达西海

岸暴发持续了将近 11 个月的短凯伦藻赤潮, 导致大型鲨鱼及海洋生物死亡, 是历史上最严重的赤潮之一(Steidinger, 2009)。米氏凯伦藻最早于 1935 年报道自日本海域, 目前已在挪威、新西兰、澳大利亚、南美、北非和中国等海域引发过赤潮, 该种是全球范围内凯伦藻类赤潮的主要肇事种(Oda, 1935; Seki *et al.*, 1995; Sellem *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2019)。

在我国近海, 米氏凯伦藻也是典型的有害赤潮致灾种。自 20 世纪 90 年代起, 米氏凯伦藻在我国近海海域(特别在我国东海海域)多次暴发有害赤潮(Lu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019)。仅 2006—2018 年间, 在我国沿海报道的米氏凯伦藻赤潮事件超过 100 起, 其中在 2012 年尤其严重, 致使养殖鲍鱼大面积死亡, 总经济损失达 20.11 亿元(Li *et al.*, 2017; 中国海洋灾害

* 国家重点研发计划, 2017YFC1404301 号, 科技基础资源调查专项, 2018FY100200 号; 国家自然科学基金项目 41876173 号, 41906112 号。林雅柔, 硕士研究生, E-mail: linyarou@126.com

通信作者: 岑竞仪, 实验师, 硕士, E-mail: jingyicen@gmail.com

收稿日期: 2020-01-03, 收修改稿日期: 2020-07-25

公报, 2013)。米氏凯伦藻会对鱼类和哺乳动物造成负面影响, 抑制浮游动物的生长发育、摄食和采卵, 从而降低捕食者对其的摄食压力; 并会抑制某些敏感贝类幼体早期发育, 严重时可致其幼体和成体死亡(王朝晖等, 2001; 孙军等, 2007; Mitchell *et al*, 2007; 孙科等, 2010; Basti *et al*, 2015; Lin *et al*, 2015; Li *et al*, 2017)。

近年来, 随着研究的深入, 越来越多的凯伦藻种类被分离并鉴定, 多个种类共同形成赤潮的现象也时有发生。如, 在 2007—2008 年佛罗里达西海岸的短凯伦藻赤潮事件中, 共分离鉴定出 4 种凯伦藻等, 包括米氏凯伦藻、鞍形凯伦藻(*K. selliformis*)、蝶形凯伦藻(*K. papilionacea*)和 1 种未知凯伦藻(*Karenia* sp.)(Wolny *et al*, 2015)。2003 年 5 月在澳大利亚沿岸也曾暴发了一起由 5 种凯伦藻(*K. longicanalis*、*K. asterichroma* 及其他 3 种 *Karenia* spp.)混合组成的赤潮(de Salas *et al*, 2004)。在我国近海, 复合型凯伦藻赤潮也有发生, 如 1998 年暴发于香港海域的凯伦藻赤潮, 其优势种为米氏凯伦藻和指沟凯伦藻(*K. digitata*, 现已修订为指沟卡罗藻 *Karlodinium digitatum*)(Lu *et al*, 2004)。

溶血毒素是一种结构和成分较为复杂的多成分混合物, 目前已知的组成成分有糖脂类(glycolipids)、糖苷类和多不饱和脂肪酸类化合物、肽类和蛋白质类物质等(刘桂英等, 2015)。1994 年 Arzul 等(1994)首次报道米氏凯伦藻法国菌株系对鲱鱼红细胞具有溶血活性, 随后研究者发现不同地理株系(英格兰、美国、日本和中国)的米氏凯伦藻对鱼类及陆生哺乳动物红细胞也具有溶血活性(Cho *et al*, 2017)。已报道具有溶血活性的凯伦藻种类有米氏凯伦藻、协和凯伦藻(*K. concordia*)和短凯伦藻, 而其他凯伦藻是否具有溶血活性目前尚未见报道(Neely *et al*, 2016; Tatters *et al*, 2010; Brand *et al*, 2012)。

2016 年 1 月 1 日至 2 月 8 日, 在中国香港吐露港海域暴发凯伦藻赤潮, 其主要肇事种为米氏凯伦藻和少量蝶形凯伦藻, 此次赤潮导致大量养殖鱼死亡(渔农自然护理署, 2016)。本文作者从此次赤潮香港吐露港海域以及邻近香港的大鹏湾海域采集的样品中分离出 4 种凯伦藻(蝶形凯伦藻、鞍形凯伦藻、长沟凯伦藻和米氏凯伦藻)。本文对此 4 种凯伦藻的混合生长特性和溶血活性进行研究, 比较分析不同凯伦藻混合培养对溶血活性的影响, 旨在探究单一凯伦藻和复合型凯伦藻赤潮溶血活性的差异, 为我国

有害赤潮的防治与研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验藻种

本实验所用 4 种凯伦藻分别为蝶形凯伦藻 CCHA-12 (Genbank: MT754557)、鞍形凯伦藻 CCHA-7 (Genbank: MT754561)、长沟凯伦藻 CCHA-9 (Genbank: MT754556)和米氏凯伦藻 CCHA-1 (Genbank: MT754546)。蝶形凯伦藻和鞍形凯伦藻为 2016 年 1 月底香港赤潮时分离, 米氏凯伦藻和长沟凯伦藻于 2016 年 4 月底分离自香港邻近的大鹏湾海域。单细胞克隆培养后, 在电镜及光镜下对其形态观察。藻种保存于暨南大学赤潮与海洋生物学研究中心藻类种质资源库。所有实验在光照培养箱中进行, 培养条件为: 培养液为 L1 培养基, 光照强度为 3500—3800lx, 光暗比为 12h : 12h, 温度为(20±1)°C。同时, 以东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)为阴性对照藻种(已知东海原甲藻的超声破碎细胞提取液无溶血活性)(周成旭等, 2007)。每个实验组设置 3 个生物学重复。

1.2 扫描电镜及光学显微镜方法

扫描电镜: 用浓度为 2.5%戊二醛固定, 4°C 冰箱静置 12h。然后依次用 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% (2 次)的乙醇进行梯度脱水, 再经二氧化碳临界点干燥和喷金导电, 最后在扫描电镜观察(wang *et al*, 2018)。

光学显微镜: 通过奥林巴斯正置显微对指数期的藻细胞进行观察, 并采集照片, 使用 image - pro Plus 6.0 图像采集和分析软件(QImaging, Surrey, BC, Canada)测量细胞长度和宽度 (wang *et al*, 2018)。

1.3 比生长速率计算方法

比生长速率 μ (单位: /d)计算公式如下:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N) / \Delta t, \quad (1)$$

式中, N_t 为培养 t 天的藻细胞密度; N 为起始的藻细胞密度; Δt 表示培养时间间隔。

1.4 凯伦藻溶血毒素的提取

取指数生长期的凯伦藻藻液, 于倒置显微镜下用细胞计数板统计密度后(表 1), 用以检测单种凯伦藻溶血活性。另外, 将此密度下的 4 种凯伦藻按照表 2 列出的不同混合方式等体积混合, 共培养 3 天后, 在光学显微镜下根据四种凯伦藻不同形态区分并统计各自密度, 离心收集藻细胞。

显微镜计数方法: 1mL 藻液加入鲁格氏试剂染色,

然后用漩涡混匀器将其充分混匀,准确吸取藻液细胞 0.1mL,置于容量为 0.1mL、表面积为 20mm×20mm 的计数框内,在 200 倍显微镜下全部计数,计数 3 次取其平均值(张士瑾等,1997;周永欣等,1989)。

溶血毒素提取方法参照 Eschbach 等(2001),将收集的藻细胞重悬于 400 μ L 缓冲液中,于超声破碎仪中冰浴破碎(破碎功率 10%,时长 5min,每次脉冲 2s,脉冲间隔 1s),获得细胞破碎液用于溶血毒素提取液。

表 1 四株凯伦藻取样密度
Tab.1 Sample density of the four *Karenia* species

藻株	蝶形凯伦藻	鞍形凯伦藻	长沟凯伦藻	米氏凯伦藻	东海原甲藻
藻密度($\times 10^6$ cells/L)	2.46	3.26	1.80	4.38	35.06

表 2 各组凯伦藻混合前后初始密度
Tab.2 The initial density of each group before and after being mixed

组别	初始凯伦藻密度($\times 10^6$ cells/L)				总计	三天后凯伦藻密度($\times 10^6$ cells/L)				总计
	蝶形凯伦藻	鞍形凯伦藻	长沟凯伦藻	米氏凯伦藻		蝶形凯伦藻	鞍形凯伦藻	长沟凯伦藻	米氏凯伦藻	
A	\	1.63	\	2.19	3.82	\	2.40	\	4.25	6.65
B	1.23	1.63	\	\	2.86	2.80	1.90	\	\	4.70
C	\	1.63	0.90	\	2.53	\	2.80	0.60	\	3.40
D	\	\	0.90	2.19	3.09	\	\	0.70	2.50	3.20
E	1.23	\	0.90	\	2.13	6.75	\	2.30	\	9.05
F	1.23	\	\	2.19	3.42	3.00	\	\	2.35	5.35
G	\	1.09	0.60	1.46	3.15	\	4.05	0.40	2.40	6.85
H	0.82	1.09	\	1.46	3.37	1.05	0.90	\	1.15	3.10
I	0.82	1.09	0.60	\	2.51	2.50	1.05	0.55	\	4.10
J	0.82	\	0.60	1.46	2.88	1.65	\	1.15	2.15	4.95
K	0.62	0.82	0.45	1.10	2.98	2.45	2.15	0.90	2.55	8.05

注: A—F: 两种藻混合; G—J: 三种藻混合; K: 四种藻混合

1.5 凯伦藻溶血活性检测

称取 8g NaCl、0.2g KCl、3.58g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 0.215g KH_2PO_4 , 溶解至 1L 高纯水中, 用 0.1mol/L HCL 盐酸调 pH 7.4, 制备成兔红细胞缓冲液, 储存于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

称取 8.775g NaCl、0.238g KCl、0.15g MgSO_4 、0.551g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 1.476g TRIS 溶解至 1L 高纯水中, 用 0.1mol/L HCL 盐酸调 pH 7.4, 制备成溶血毒素缓冲液, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱储存备用。

取购买自蕊特生物公司的 EDTA 抗凝兔血 100mL, 800r/min 离心洗涤两次, 每次 10min。以兔血缓冲液为溶剂, 配制成 0.6% 的兔红细胞溶液。

溶血活性测定参照周成旭等(2007)方法并略有改进。取 150 μ L 溶血毒素提取液和 150 μ L 0.6% 的兔红细胞于 1.5mL 离心管中混匀, 置于 20 $^\circ\text{C}$, 光照强度为 100 $\mu\text{mol}(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的条件下反应 5h; 再于 20 $^\circ\text{C}$ 下, 3000r/min, 离心 10min, 取上清液于酶标仪 414nm 处检测其吸光值。每个反应设置 3 个平行样。

溶血活性计算公式为:

溶血活性百分数(%)=(As-Ab-Aa)/Ac $\times 100\%$, (2)
式中, As: 150 μ L 的溶血毒素提取液与 150 μ L 0.6% 的兔红细胞置于上述条件下反应后的离心上清液的吸光值; Aa: 150 μ L 的溶血毒素的缓冲液与 150 μ L 0.6% 的兔红细胞置于上述条件下相同时间后离心上清液的吸光值; Ab: 150 μ L 的溶血毒素提取液与 150 μ L 兔红细胞缓冲液置于上述条件下相同时间后离心上清液的吸光值; Ac: 150 μ L TritonX-100 与 150 μ L 0.6% 兔红细胞置于上述条件下相同时间后离心上清液的吸光值。

每细胞溶血活性计算公式: 每细胞溶血活性百分数(%)=溶血活性百分数 \div 总细胞数. (3)

1.6 数据分析

使用 origin 2018 软件绘图, 数据使用 SPSS 软件 ANOVA、LSD 功能进行方差分析, 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 结果与分析

2.1 种凯伦藻形态学特征

长沟凯伦藻, 单细胞, 细胞长 21.7—31.7 μm , 宽 15.6—26.3 μm 。细胞呈近圆球形或卵圆形, 背腹扁平程度低, 上下壳部均呈现半球形。顶沟长, 腹面达到横沟上边缘之下。上壳部具有放射状的犁沟, 纵沟在上壳部具有指状入侵(图 1a, 1e)。

米氏凯伦藻, 单细胞, 细胞长 15.6—31.2 μm , 宽 13.2—24 μm 。细胞背腹面呈近宽卵圆形, 背腹略扁

平, 上锥部为半球形或略宽的圆锥形。纵沟入侵上壳部呈指状。顶沟平直, 其顶端有一个缺口(图 1b, 1f)。

蝶形凯伦藻, 单细胞, 长 18—32 μm , 宽 18—48 μm , 长宽比约为 1:1, 部分细胞宽大于长。细胞背腹扁平, 上顶端突出形成龙骨突状, 下壳部腹面凹进, 背面凸起, 两裂片状(图 1c, 1g)。

鞍形凯伦藻, 单细胞, 细胞平均长 20—30 μm , 宽 16—30 μm 。上壳部扁平, 半圆形或圆锥形, 顶端不突出, 无龙骨突。下壳部底部不平截, 中央凹陷深, 底端两裂片呈马鞍形(图 1d, 1h)。

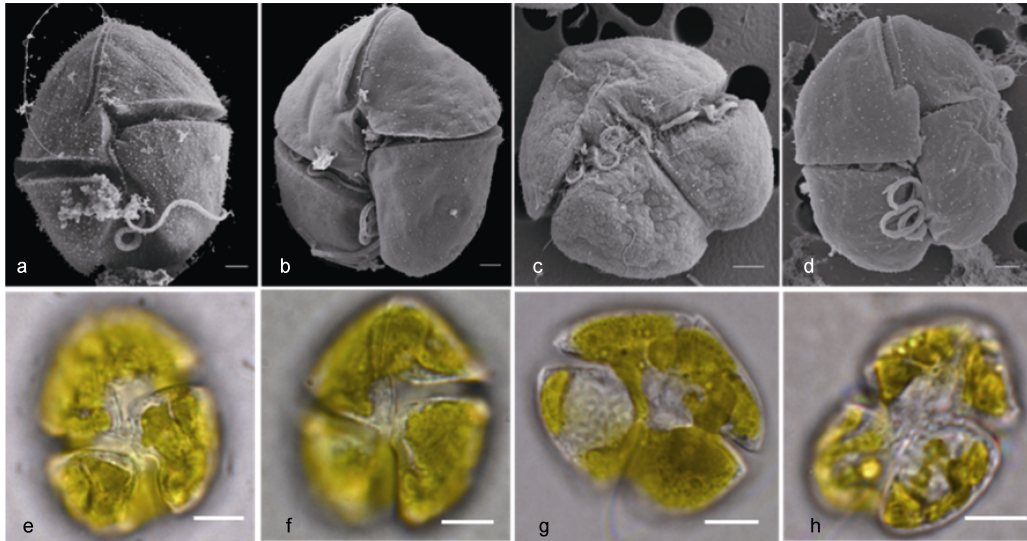


图 1 四种凯伦藻形态照片

Fig.1 The images of strains of four *Karenia* species

注: a, e: 长沟凯伦藻; b, f: 米氏凯伦藻; c, g: 蝶形凯伦藻; d, h: 鞍形凯伦藻。

a—d 为四种凯伦藻电镜照片, 比例尺=2 μm ; e—h 为四种凯伦藻扫描光镜照片, 比例尺=10 μm 。

2.2 凯伦藻比生长速率及种间作用

取培养 3 天的不同凯伦藻混合组藻液, 于显微镜下镜检细胞密度, 结果如表 2 所示。培养 3 天后各组藻密度均维持在 10^6 cells/L 左右, 但未达到 10^7 cells/L。分析发现, 当两种不同的凯伦藻进行混合培养时存在种间相互作用: 长沟凯伦藻会抑制米氏凯伦藻和鞍形凯伦藻生长, 促进蝶形凯伦藻的生长(图 2a); 蝶形凯伦藻会抑制米氏凯伦藻和鞍形凯伦藻生长(图 2b); 鞍形凯伦藻会抑制长沟凯伦藻生长, 对米氏凯伦藻和蝶形凯伦藻生长无明显影响(图 2c); 米氏凯伦藻抑制长沟凯伦藻生长, 微弱地抑制鞍形凯伦藻生长, 而对蝶形凯伦藻生长无明显的影响(图 2d)。

对各实验组的比生长速率进行分析, 结果表明,

4 种凯伦藻按照不同组合混合 3 天的平均比生长速率差异较大, 混合组内凯伦藻间存在种间相互影响。比生长速率最高组为 E 混合组(0.48/d), 其次为 G 组和 K 组, 分别为 0.26 和 0.29/d。各凯伦藻比生长速率范围为: 米氏凯伦藻-0.21—0.22/d、蝶形凯伦藻-0.05—0.58/d、长沟凯伦藻-0.27—0.31/d、鞍形凯伦藻-0.20—0.30/d。其中 E 组内的蝶形凯伦藻生长速率为 0.58/d, 高于其单种指数生长期平均生长速率(0.48/d), 说明蝶形凯伦藻与长沟凯伦藻混合后提高其比生长速率。混合组 H 的比生长速率为-0.03/d, 混合组内的米氏凯伦藻(-0.21/d), 鞍形凯伦藻(-0.20/d)和蝶形凯伦藻(-0.05/d), 比生长速率为负值, 说明混合 3 天后三种藻的细胞密度都比初始值低, 3 种凯伦藻间存在相互抑制作用(表 3)。

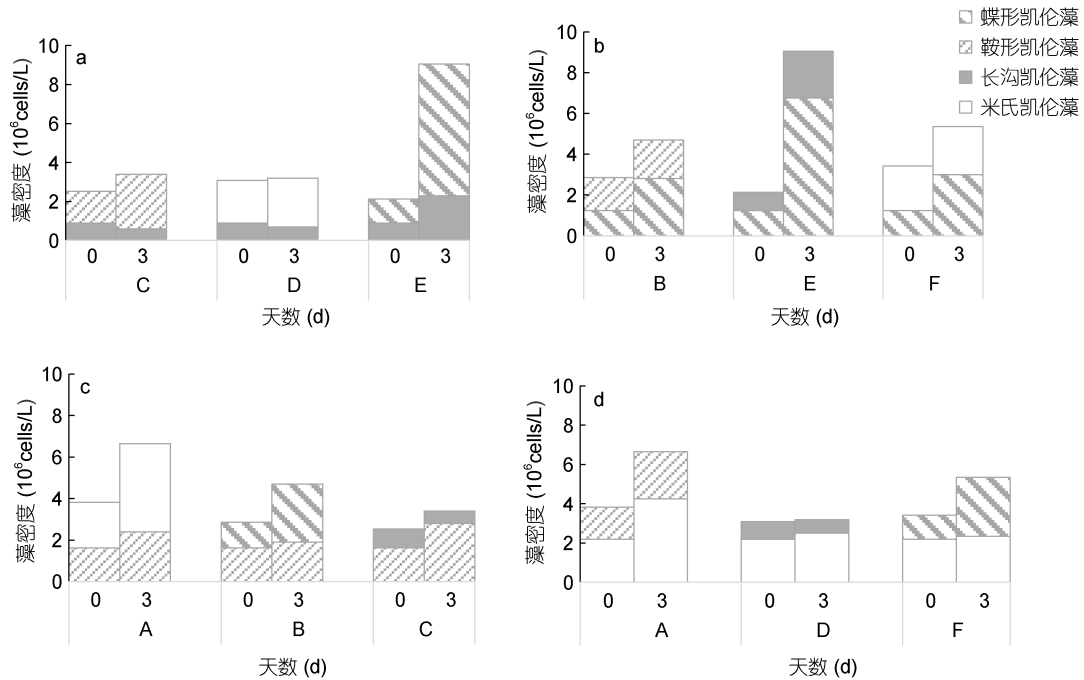


图 2 四种凯伦藻对其他藻化感作用

Fig.2 The allelopathic effects of four species of *Karenia* on other algae

表 3 4 种凯伦藻不同组合的比生长速率

Tab.3 The growth rates of different combinations of four *Karenia* species

比生长速率(d)	组别	单种藻	混合藻										
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
	鞍形凯伦藻	0.53	0.13	0.05	0.18	\	\	\	0.3	-0.2	-0.15	\	0.09
	长沟凯伦藻	0.49	\	\	-0.14	-0.08	0.31	\	-0.27	\	-0.16	0.08	0
	蝶形凯伦藻	0.48	\	0.27	\	\	0.57	0.3	\	-0.05	0.07	0.1	0.05
	米氏凯伦藻	0.51	0.22	\	\	0.04	\	0.02	0.03	-0.21	\	-0.01	0.05
	平均比生长速率	\	0.18	0.17	0.1	0.01	0.48	0.15	0.26	-0.03	0.07	0.18	0.29

2.3 凯伦藻的溶血活性

4 种凯伦藻单独培养时与对照组(海水组、东海原甲藻组)相比,表现出明显的溶血活性。4 种凯伦藻的溶血活性百分数从高到低依次为长沟凯伦藻(46.36%±1.02%),鞍形凯伦藻(42.33%±0.66%),米氏凯伦藻(37.81%±0.82%)和蝶形凯伦藻(37.02%±0.64%)(图 3)。本研究的米氏凯伦藻大鹏湾株的溶血活性(0.33×10⁴cells/mL)与中国福建株系(1.2×10⁴cells/mL)和日本(Suo Nada)株系对兔血的溶血活性相近,为 37.81%±0.82%(表 4)。

与对照组相比,两种凯伦藻共培养实验组(A—F 组)均表现出溶血活性。溶血活性最高的前三组依次为 D 组(长沟凯伦藻与米氏凯伦藻共培养)、C 组(长沟凯伦藻与鞍形凯伦藻共培养)和 B 组(长沟凯伦藻与蝶

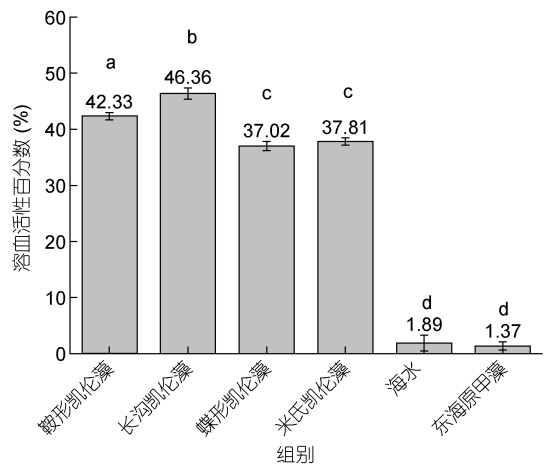


图 3 四株凯伦藻的溶血活性及每细胞溶血活性

Fig.3 Hemolytic activity of four *Karenia* species

注: a、b、c、d 表示组之间具有显著差异, P < 0.05

表 4 不同地理株系凯伦藻溶血活性
Tab.4 The hemolytic activity of strains from different *Karenia* species

藻种名	分离地点	对兔血溶血活性	密度(10^4 cells/mL)	引用
米氏凯伦藻	日本 Fukuoka Bay	无溶血活性	4—5	Zou <i>et al.</i> , 2010
米氏凯伦藻	日本 Suo Nada	39%	8—10	Zou <i>et al.</i> , 2010
米氏凯伦藻	日本 Hiroshima Bay	10%—20%	0.02	Cho <i>et al.</i> , 2017
米氏凯伦藻	日本 Kyushu Island	70%	2	Kim <i>et al.</i> , 2020
米氏凯伦藻	中国福建海域	38.67%±10.69 52.44%±2.67	1.2 3.8	Li <i>et al.</i> , 2017
米氏凯伦藻	中国深圳大鹏湾海域	37.81%±0.82%	0.326	本文
鞍形凯伦藻	中国香港海域	42.33%±0.66%	0.246	本文
长沟凯伦藻	中国深圳大鹏湾海域	46.36%±1.02%	0.180	本文
蝶形凯伦藻	中国香港海域	37.02%±0.64%	0.438	本文

形凯伦藻共培养), 溶血活性依次为 $56.54\% \pm 1.49\%$ 、 $56.44\% \pm 1.09\%$ 和 $53.70\% \pm 1.13\%$ 。三种凯伦藻共培养实验组(G—J 组)的溶血活性百分数与对照组相比均有显著差异, 其中 G 组(长沟凯伦藻、鞍形凯伦藻、米氏凯伦藻)和 I 组(长沟凯伦藻、鞍形凯伦藻、蝶形凯伦藻)溶血活性超过 50% (分别为 $52.49\% \pm 0.62\%$ 和 $50.57\% \pm 0.73\%$)。四种凯伦藻混合组(K 组)测得的溶血活性溶血百分数为 $57.05\% \pm 1.13\%$ (图 4)。

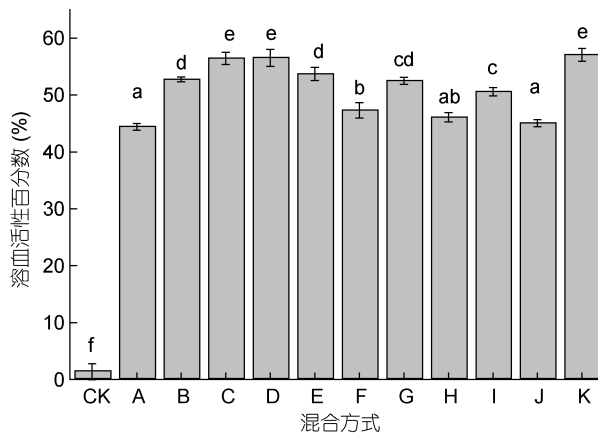


图 4 混合组凯伦藻溶血活性

Fig.4 Hemolytic activity of four *Karenia* species mixed
注: CK 为东海原甲藻组, 不同小写字母(a—f)表示组间具有显著差异, $P < 0.05$

每细胞溶血活性计算结果表明, 4 种凯伦藻单一培养时每细胞活性从高到低为长沟凯伦藻>蝶形凯伦藻>鞍形凯伦藻>米氏凯伦藻, 每细胞溶血活性分别为 2.58 、 1.51 、 1.30 和 $0.86 \times 10^{-3}\%/cell$ 。混合后每细胞溶血活性百分数为 $(0.59—1.77) \times 10^{-3}\%/cell$, 与单种相比表现出下降的趋势。混合组 D 组(长沟凯伦藻和米氏凯伦藻)每细胞溶血活性最高, 为 $1.77 \times$

$10^{-3}\%/cell$, E 组(长沟凯伦藻和蝶形凯伦藻)每细胞溶血活性最低, 为 $0.59 \times 10^{-3}\%/cell$ 。4 种凯伦藻间相互混合能够增加对兔血的溶血活性, 但不会提高单位细胞溶血活性(图 5)。

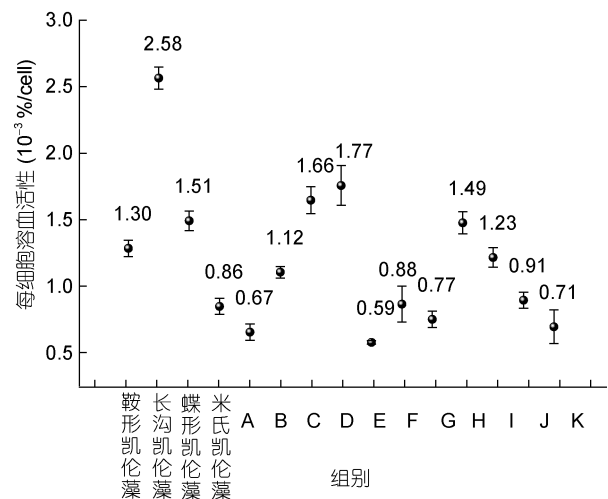


图 5 不同混合方式凯伦藻每细胞溶血活性

Fig.5 Hemolytic activity per cell of *Karenia* species in different mixing methods

3 讨论

赤潮是海洋中某种或某几种生物在短时间内大量聚集或者异常增殖而引起海水变色的现象, 其归根结底是赤潮优势种在各种理化条件下获得竞争优势, 从而占据生态位的过程。赤潮生物种群演替也是赤潮生物之间的种间竞争的结果。海洋微藻通过产生胞外活性物质参与种间竞争(化感作用), 进而间接实现藻类与其他生物类群之间、藻类不同种群间的相互作用, 从而影响藻类群落的组成、演替和平衡。藻类

的化感作用可能是促使其形成赤潮的动力学的机制之一(Smayda, 1997; Legrand *et al.*, 2003)。研究报道, 大约有 40 种有毒有害浮游藻类(海洋和淡水种类)对其它藻类存在化感作用(Granéli *et al.*, 2008; Poulin *et al.*, 2018)。本研究中分离自中国南海的 4 种凯伦藻相互间都具有化感作用, 并存在种间差异。其中鞍形凯伦藻和米氏凯伦藻分别与长沟凯伦藻混合时, 都会抑制长沟凯伦藻的生长(比生长速率分别为 -0.14 和 $-0.08/d$); 蝶形凯伦藻与长沟凯伦藻混合时, 蝶形凯伦藻的比生长速率高于单种藻平均生长速率, 可见长沟凯伦藻促进其生长。3 种凯伦藻混合组内种间也有相互抑制生长的化感作用, 其中鞍形凯伦藻、蝶形凯伦藻和长沟凯伦藻混合组的抑制作用最明显, 比生长速率都为负值。

实验室研究发现, 同一种藻可对不同藻类产生化感作用。如, 米氏凯伦藻与东海原甲藻、塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*), 中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*), 球等鞭金藻 (*Isochrysis galbana*), 杜氏藻 (*Dunaliella tertiolecta*)等藻类共培养时会抑制其生长(Gentien *et al.*, 1990; Uchida *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2011; He *et al.*, 2016)。同一种藻对其他不同藻类的化感作用具有种间差异。如, 新月筒柱藻 (*Cylindrotheca clostetium*)会抑制东海原甲藻生长, 但对心形原甲藻 (*Prorocentrum cordatum*), 球等鞭金藻和旋链角毛藻 (*Chaetoceros curvisetus*)化感作用不明显(Xu *et al.*, 2019)。短凯伦藻会抑制假微海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*)生长, 但对冰河拟星杆藻 (*Asterionellopsis glacialis*)的化感作用不明显(Poulson-Ellestad *et al.*, 2014)。进一步研究发现, 即便同一株系对同一种藻的化感作用也是可变的。Poulin 等(2018)对短凯伦藻 5 个不同的株系(CCMP 2228, CCMP 2229, CCMP 2281, TxB3, TxB4)开展化感作用研究, 5 个株系的短凯伦藻对冰河拟星杆藻的化感作用是高度可变, 同一株系可以强烈抑制冰河拟星杆藻生长或无化感作用或极其微弱的促进作用, 研究还表明这种化感作用的可变性与短凯伦藻的几种代谢物浓度相关。

溶血毒素被认为是凯伦藻赤潮引起海洋鱼类及其他海洋生物的大量死亡的主要原因之一(Li *et al.*, 2017, 2019)。海洋藻类溶血毒素是其次生代谢的产物, 该类物质种类繁多, 结构和成分复杂。已明确具有溶血活性的凯伦藻类有米氏凯伦藻、短凯伦藻和鞍形凯伦藻(Tatters *et al.*, 2010; Brand *et al.*, 2012)。其中米氏

凯伦藻溶血毒素包括两种糖脂类物质(monogalactosyl diacylglycerol 和 digalactosyl diacylglycerol)和一种脂类物质(octadecapentaenoic acid)(Parrish *et al.*, 1998)。本研究结果表明, 分离于中国南海海域的 4 种凯伦藻对兔血细胞都具有溶血活性, 其中蝶形凯伦藻和长沟凯伦藻的溶血活性为首次报道。海洋微藻引起的溶血活性及鱼毒性与多聚不饱和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFA)相关, 研究发现米氏凯伦藻中分离的 PUFA 具有溶血活性, 而蝶形凯伦藻和伞辐凯伦藻 (*K. umbrella*)(现修订为长沟凯伦藻)也能产生 PUFA, 这可能是它们具有溶血活性的原因(Yasumoto *et al.*, 1990; Fu *et al.*, 2004; Hyun *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018)。在本研究中, 长沟凯伦藻的溶血活性在四种凯伦藻中溶血活性最高, 且在每种混合培养方式中(两种、三种、四种混合培养), 溶血活性最高的混合组皆为含有长沟凯伦藻的组。但目前尚未有长沟凯伦藻可产毒素的报道, 也没有表明对人类有伤害, 仅对鱼有致死现象(Brand *et al.*, 2012)。

不同株系的米氏凯伦藻的溶血活性存在差异, 同一株系对不同生物红细胞的溶血活性也存在差异(Zou *et al.*, 2010)。本研究的深圳大鹏湾株的米氏凯伦藻溶血活性为 37.81%与中国福建海域株系 (1.2×10^4 cell/L)对兔血的溶血活性(38.67%)相近(Li *et al.*, 2017)。米氏凯伦藻英国株系和美国德州株系对红鱼 (*Sciaenops ocellatus*)血细胞的溶血活性约为 50%对分离于日本不同海湾的 6 株米氏凯伦藻溶血活性研究发现, 其中 3 株对兔血无溶血活性, 而另外 3 株对兔血的溶血活性差异较大分别为 10%—20%、39%及 70% (Zou *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2017; Kima *et al.*, 2020)。Yang 等(2011)研究发现, 米氏凯伦藻与东海原甲藻、塔玛亚历山大藻混合培养后, 会增加米氏凯伦藻溶血活性。同样, 本研究结果表明, 4 种凯伦藻相互混合培养后其溶血活性相对于单种凯伦藻会有显著增加, 其中 4 种凯伦藻共培养的溶血活性溶血最高。

据统计, 1934—2018 年全球有明确记录的米氏凯伦藻赤潮事件有 87 起, 其中导致鱼类死亡的 34 件, 导致贝类死亡的有 13 件, 导致其他生物死亡的有 10 件, 无报道生物死亡的有 49 件(Li *et al.*, 2019)。凯伦藻个体小, 不同种藻细胞形态差异小, 在光学显微镜下很难区别。因此, 在野外条件下常常无法准确判定赤潮肇事种为某一凯伦藻还是多种凯伦藻混合, 故也难以判定赤潮灾害是由单一藻种还是混合藻种所致。2007 年 9 月至 2008 年 1 月, 美国佛罗里达州东

海岸暴发了一次以短凯伦藻为主并混合其他 4 种凯伦藻的赤潮, 研究人员从海域养殖贝壳中检测出神经性贝类毒素(neurotoxic shellfish poisoning), 并且赤潮过程中导致鱼类死亡及人类呼吸系统疾病等(Wolny *et al*, 2015)。2019 年 5 月我国福建海域暴发以东海原甲藻和“米氏凯伦藻”为主要肇事种的赤潮, 该赤潮导致 2700 万人民币损失(中国海洋灾害公报, 2020), 而对赤潮优势种进一步分析发现, 此次赤潮的肇事种以指沟卡罗藻和东海原甲藻为主, 同时混有蝶形凯伦藻及其他凯伦藻科种类(Cen *et al*, 2020)。结合本研究结果——米氏凯伦藻、鞍形凯伦藻、蝶形凯伦藻和长沟凯伦藻 4 种凯伦藻, 不论是两种、还是三种、四种共同培养时, 溶血活性都显著高于单一藻种, 可见, 混合型凯伦藻赤潮的致灾效应更为严重, 其成灾机制还需进一步深入研究。

4 结论

对分离于中国南海的 4 种凯伦藻(蝶形凯伦藻、鞍形凯伦藻、长沟凯伦藻和米氏凯伦藻)进行种间作用和溶血活性研究表明, 该 4 种凯伦藻均对兔血均具有溶血活性; 该 4 种凯伦藻不论是两种、还是三种、四种共同培养时, 溶血活性都显著高于单一藻种。混合培养时, 凯伦藻存在种间相互作用, 长沟凯伦藻会促进蝶形凯伦藻的生长, 鞍形凯伦藻和米氏凯伦藻会抑制长沟凯伦藻生长。

参 考 文 献

- 王朝晖, 尹伊伟, 齐雨藻等, 2001. 珠海桂山岛米氏裸甲藻赤潮对鱼鳃损伤的病理学组织观察. 海洋学报, 23(1): 133—138
- 中国海洋灾害公报, 2013. 2012 年中国海洋灾害公报. 中华人民共和国自然资源部. http://gc.mnr.gov.cn/201806/t20180619_1798016.html
- 中国海洋灾害公报, 2020. 2019 年中国海洋灾害公报. 中华人民共和国自然资源部. http://gi.mnr.gov.cn/202004/t20200430_2510979.html
- 刘桂英, 葛 坤, 宋 伦等, 2015. 米氏凯伦藻的研究进展. 海洋科学, 39(9): 117—122
- 孙 军, 宋书群, 徐兆礼等, 2007. 东海米氏凯伦藻水华中中华哲水蚤的选择性摄食. 海洋与湖沼, 38(6): 536—541
- 孙 科, 颜 天, 周名江等, 2010. 米氏凯伦藻对褶皱臂尾轮虫、卤虫和黑褐新糠虾存活的影响. 海洋科学, 34(9): 76—81
- 张士瑾, 马军英, 范 晓, 1997. 海洋生物技术原理和应用. 北京: 海洋出版社, 96—100
- 周永欣, 章宗涉, 1989. 水生生物毒性试验方法. 北京: 农业出版社, 170—190
- 周成旭, 傅永静, 严小军, 2007. 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
- 俞志明, 陈楠生, 2019. 国内外赤潮的发展趋势与研究热点. 海洋与湖沼, 50(3): 474—486
- 渔农自然护理署, 2016. http://redtide.afcd.gov.hk/index_tc.html?mode=0
- Arzul G, Gentien P, Crassous M P, 1994. A haemolytic test to assay toxins excreted by the marine dinoflagellate *Gyrodinium cf. Aureolum*. Water Research, 28(4): 961—965
- Baden D G, 1989. Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins. The FASEB Journal, 3(7): 1807—1817
- Baden D G, Mende T J, Block R E, 1979. Two similar toxins isolated from *Gymnodinium breve*. In: Toxic Dinoflagellate Blooms. New York: Elsevier, 327—334
- Basti L, Nagai S, Go J *et al*, 2015. Differential inimical effects of *Alexandrium* spp. and *Karenia* spp. on cleavage, hatching, and two larval stages of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. Harmful Algae, 43: 1—12
- Brand L E, Campbell L, Bresnan E, 2012. *Karenia*: The biology and ecology of a toxic genus. Harmful Algae, 14: 156—178
- Cen J Y, Wang J Y, Huang L F *et al*, 2020. Who is the “murderer” of the bloom in coastal waters of Fujian, China, in 2019?. Journal of Oceanology and Limnology, 38(3): 722—732
- Cho K, Kasaoka T, Ueno M *et al*, 2017. Haemolytic activity and reactive oxygen species production of four harmful algal bloom species. European Journal of Phycology, 52(3): 311—319
- de Salas M F, Bolch C J S, Hallegraeff G M, 2004. *Karenia umbella* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new potentially ichthyotoxic dinoflagellate species from Tasmania, Australia. Phycologia, 43(2): 166—175
- Eschbach E, Scharsack J P, John U *et al*, 2001. Improved erythrocyte lysis assay in microtitre plates for sensitive detection and efficient measurement of haemolytic compounds from ichthyotoxic algae. Journal of Applied Toxicology, 21(6): 513—519
- Fu M, Koulman A, van Rijssel M *et al*, 2004. Chemical characterisation of three haemolytic compounds from the microalgal species *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae). Toxicon, 43: 355—363
- Gentien P, Arzul G, 1990. Exotoxin production by *Gyrodinium Cf. aureolum* (Dinophyceae). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 70(3): 571—581
- Granéli E, Weberg M, Salomon P S, 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. Harmful Algae, 8(1): 94—102
- Haywood A J, Steidinger K A, Truby E W *et al*, 2004. Comparative morphology and molecular phylogenetic analysis of three new species of the genus *Karenia* (Dinophyceae) from New Zealand. Journal of Phycology, 40(1): 165—179
- He D, Liu J, Hao Q *et al*, 2016. Interspecific competition and allelopathic interaction between *Karenia mikimotoi* and *Dunaliella salina* in laboratory culture. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 34(2): 301—313

- Hyun B, Ju S J, Ko A R *et al*, 2016. Thermal effects on the growth and fatty acid composition of four harmful algal bloom species: Possible implications for ichthyotoxicity. *Ocean Science Journal*, 51(3): 333—342
- Kim D, Li W C, Matsuyama Y *et al*, 2020. Strain-dependent lethal effects on abalone and haemolytic activities of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi*. *Aquaculture*, 520: 734953
- Legrand C, Rengefors K, Fistarol G O *et al*, 2003. Allelopathy in phytoplankton-biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*, 42(4): 406—419
- Lin J N, Song J J, Yan T *et al*, 2015. Large-scale dinoflagellate bloom species *Prorocentrum donghaiense* and *Karenia mikimotoi* reduce the survival and reproduction of copepod *Calanus sinicus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95(6): 1071—1079
- Li X D, Yan T, Lin J N *et al*, 2017. Detrimental impacts of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* in Fujian coastal waters on typical marine organisms. *Harmful Algae*, 61: 1—12
- Li X D, Yan T, Yu R C *et al*, 2019. A review of *Karenia mikimotoi*: bloom events, physiology, toxicity and toxic mechanism. *Harmful Algae*, 90: 101702
- Lu D D, Qi Y Z, Gu H F *et al*, 2014. Causative species of harmful algal blooms in Chinese coastal waters. *Algological Studies*, 145—146(1): 145—168
- Lu S H, Hodgkiss I J, 2004. Harmful algal bloom causative collected from Hong Kong waters. *Hydrobiologia*, 512(1—3): 231—238
- Mitchell S, Rodger H, 2007. Pathology of wild and cultured fish affected by a *Karenia mikimotoi* bloom in Ireland, 2005. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 27(1): 39—42
- Mooney B D, Nichols P D, de Salas M F *et al*, 2007. Lipid, Fatty acid, and sterol composition of eight species of Kareniaceae (Dinophyta): Chemotaxonomy and Putative lipid phycotoxins. *Journal of Phycology*, 43(1): 101—111
- Neely T, Campbell L, 2006. A modified assay to determine hemolytic toxin variability among *Karenia clones* isolated from the Gulf of Mexico. *Harmful Algae*, 5(5): 592—598
- Oda M, 1935. The red tide of *Gymnodinium mikimotoi* sp. (MS) and the effect of mtefing copper sulphate to prevent the growth of it. *Dobutsugaku Zasshi*, Zoological Society of Japan, 47(555): 35—48
- Parrish C C, Bodennec G, Gentien P, 1998. Haemolytic glycoylcerolipids from gymnodinium species. *Phytochemistry*, 47(5): 783—787
- Poulin R X, Poulson-Ellestad K L, Roy J S *et al*, 2018. Variable allelopathy among phytoplankton reflected in red tide metabolome. *Harmful Algae*, 71: 50—56
- Poulson-Ellestad K L, Jones C M, Roy J *et al*, 2014. Metabolomics and proteomics reveal impacts of chemically mediated competition on marine plankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(24): 9009—9014
- Seki T, Masayuki S, Mackenzie L *et al*, 1995. Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp.. *Tetrahedron Letters*, 36(39): 7093—7096
- Sellem F, Pesando D, Bodennec G *et al*, 2000. Toxic effects of *Gymnodinium* cf. *mikimotoi* unsaturated fatty acids to gametes and embryos of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Water Research*, 34(2): 550—556
- Smayda T J, 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography*, 42: 1137—1153
- Steidinger K A, 2009. Historical perspective on *Karenia brevis* red tide research in the Gulf of Mexico. *Harmful Algae*, 8(4): 549—561
- Tatters A O, Muhlstein H I, Tomas C R, 2010. The hemolytic activity of *Karenia selliformis* and two clones of *Karenia brevis* throughout a growth cycle. *Journal of Applied Phycology*, 22(4): 435—442
- Uchida T, Toda S, Matsuyama Y *et al*, 1999. Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241(2): 285—299
- Wang J Y, Cen J Y, Li S *et al*, 2018. A re-investigation of the bloom-forming unarmored dinoflagellate *Karenia longicanalis* (syn. *Karenia umbella*) from Chinese coastal waters. *Journal of Oceanology and Limnology*, 36(6): 2202—2215
- Wolny J L, Scott P S, Tustison J *et al*, 2015. Monitoring the 2007 Florida east coast *Karenia brevis* (Dinophyceae) red tide and neurotoxic shellfish poisoning (NSP) event. *Algae*, 30(1): 49—58
- Xu W J, Wang J T, Tan L J *et al*, 2019. Variation in allelopathy of extracellular compounds produced by *Cylindrotheca closterium* against the harmful-algal-bloom dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense*. *Marine Environmental Research*, 148: 19—25
- Yang W D, Zhang N S, Cui W M *et al*, 2011. Effects of co-existing microalgae and grazers on the production of hemolytic toxins in *Karenia mikimotoi*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(6): 1155—1163
- Yang Z B, Hodgkiss I J, 2004. Hong Kong's worst "red tide"—causative factors reflected in a phytoplankton study at Port Shelter station in 1998. *Harmful Algae*, 3(2): 149—161
- Yasumoto T, Underdal B, Aune T *et al*, 1990. Screening for hemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polylepis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters. In: Graneli E, Sundstrom B, Edler L *et al* eds. *Toxic Marine Phytoplankton*. New York: Elsevier, 436—440
- Zou Y, Yamasaki Y, Matsuyama Y *et al*, 2010. Possible involvement of hemolytic activity in the contact-dependent lethal effects of the dinoflagellate *Karenia mikimotoi* on the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Harmful Algae*, 9(4): 367—373

PRELIMINARY STUDY ON INTERSPECIFIC RELATIONSHIP AND HEMOLYTIC ACTIVITY OF FOUR *KARENIA* SPECIES FROM SOUTH CHINA SEA

LIN Ya-Rou¹, CEN Jing-Yi¹, WANG Jian-Yan², LIANG Qian-Yan¹, LYU Song-Hui¹

(1. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Department of Science Research, Beijing Museum of Natural History, Beijing 100010, China)

Abstract *Karenia* species are widely distributed in the coastal waters around the world, and are notorious for forming harmful algae blooms. In generally, the *Karenia* algae bloom isn't caused by mono-species but the simultaneous mixing of multi-species in the same family. In China coastal waters, we observed a multi-species bloom involving four *Karenia* species (*K. mikimotoi*, *K. selliformis*, *K. papilionacea*, and *K. longicanalis*) in 2016, in Hong Kong coastal area. Therefore, we conducted co-culture experiment on the four *Karenia* species in different combinations (two species, three species or four species) in laboratory, to investigate their interspecific-relationship and hemolytic activities. The results show that the four *Karenia* species significantly affected each other in the co-culture. *K. longicanalis* promoted the growth of *K. papilionacea*, and *K. selliformis* and *K. mikimotoi* inhibited the growth of *K. longicanalis*. The four *Karenia* species had significant hemolytic effects on rabbit red blood cells, and the most significant hemolytic activity was produced by *Karenia longicanalis* with a value of 46.36%±1.02%. After co-culture for three days, the hemolytic effects of all combination groups increased, and co-culture of the four species yielded the highest hemolytic effects with a value of 57.05%±1.13%.

Key words *Karenia selliformis*; *Karenia papilionacea*; *Karenia mikimotoi*; *Karenia longicanalis*; hemolytic activity; harmful algal blooms