

# 有毒赤潮藻种 *Pfiesteria piscicida* 的研究进展综述\*

颜天 周名江 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 根据1992—1999年国外发表的资料,对有毒赤潮藻种 *Pfiesteria piscicida* Steidinger *et* Burkholder sp. nov. 的结构、行为、生活史、毒素及分泌方式、危害等各方面的研究进展进行了综述。结果表明,该藻是近年才发现的一种赤潮新种,是美国东海岸危害渔业的主要有害藻,具有复杂多变的结构、“幽灵般”的行为和生活史、高活性的毒素及特殊分泌方式,对海洋生物和人类健康存在极为重要的影响。

**关键词** 赤潮 涡鞭毛藻 *Pfiesteria piscicida*

**学科分类号** X171

赤潮在1990年被联合国列为当今世界三大近海污染问题之一,赤潮灾害的多发性和普遍性极大危害了海产养殖业和渔业资源,严重破坏了正常的海洋生态系统,直接威胁着人类的生存环境和健康水平。在赤潮灾害中,鱼类的大量死亡而带来的危害和损失占相当大的比重。其中,赤潮新种 *Pfiesteria piscicida* Steidinger *et* Burkholder sp. nov. 对美国东海岸渔业造成了极大的危害,引起了科学家和政府部门的重视。本文对其复杂多变的结构、“幽灵般”的行为、生活史、极毒的毒素和特殊的分泌方式、对海洋生物的危害与对人类健康的影响,以及美国科研机构和政府正在采取的应急反应等几方面的研究进展作一介绍,以期引起中国海洋管理者、海洋科技工作者,环保及海产养殖业等各方人士的关注。

## 1 藻种的发现与分布

*Pfiesteria piscicida* 于1988年在美国北卡罗莱那州沿海的一次养殖鱼意外死亡事件中被偶然发现(Noga, 1988),以后 Smayda(1992)、Burkholder等(1992)对此进行了报道,Steidinger(1996)认为它是属于 Dinamoebales 的一个新科、新属、新种,为纪念 Pfiester 博士在其复杂的生活史研究方面作出的贡献,故用她的名字来命名这种藻。该藻具有很高的毒性,是美国东南沿海引起鱼类大量死亡(1 000条鱼以上)的一个主要原因种。由于它结构多变,生活史复杂,行为“似幽灵一般(phantom like)”,在发现它是鱼类的致死原因之前,有许多鱼类死亡事件一直未查清原因。这种藻和另两种类似种(*Pfiesteria*-like

\* 国家自然科学基金重大基金资助项目,39790110号;国家自然科学基金资助项目,39630060号。颜天,女,出生于1969年1月,助理研究员, E-mail: tianyan@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:1999-01-23,收修改稿日期:1999-04-23

complex)实际上已存在上千年,平时处于“沉睡”的无毒形态;当它们通过鱼类的分泌物或排出物感知到鱼来到了附近水域时,即从“沉睡”中醒来,迅速转变为有毒形态,开始分泌毒素,在较低密度下就可致鱼死亡,然后以之为食,因此科学家称之为“潜伏杀手”(ambush predator)。然后它们又迅速变成无毒的形态,所以在死鱼现场往往采不到有毒形态的藻种,难以确定鱼类的致死原因。这种藻对迄今为止所有研究测试过的鱼种、贝种均有致死作用。人类接触有毒水体后,会引起皮肤溃瘍;毒素的挥发能刺激眼睛,人体若吸入挥发的毒素,累积到一定程度即可产生一系列神经毒害的症状。目前还不清楚该藻产生的毒素的化学结构。

继北卡罗莱那州之后,美国马里兰州、佛罗里达州等沿海也随后陆续发现了这种藻(Lewitus *et al.*, 1995; Landsberg *et al.*, 1995)。Burkholder等(1992)曾预言在全世界亚热带和温带的营养较丰富的咸淡水区,如用合适的采样方法,都会发现这种藻或其近似种。中国幅员广阔,海岸线长,物种丰富,近年来工农业发展引起近海环境富营养化加剧,有害有毒的赤潮事件不断增加(Tseng *et al.*, 1993),沿海养殖业也存在很多不明原因的鱼虾贝死亡事件。*P. piscicida*这种“潜伏杀手”或其类似物种是否在中国沿海存在,值得引起重视,因为即使中国沿海没有该藻种,通过海运船舶的压舱水、养殖生物引种、海流以及其它渠道也极易促成海洋生物物种的异地迁移交换。例如,继国外科学家发现报道麻痹性贝毒(PSP)、腹泻性贝毒(DSP)后,中国科学家也开始了调查研究,建立分析方法,暨南大学水生生物研究所在中国南方海域采集分离到了产生PSP的 *Alexandrium tamarence* 孢囊(Qi, 1996); Zhou等<sup>1)</sup>在中国沿海进行大范围贝类采样分析后,发现PSP和DSP在中国沿海从南到北都存在,现在这两种藻毒素已成为中国贝类商品出口的必检指标,在养殖和加工过程中对PSP和DSP监测不足已严重影响了中国的贝类出口。因此作者认为,中国的海洋管理和科技工作者应及早了解并警觉有毒藻种 *P. piscicida* 可能对中国渔业生产造成的影响,以便及时采取解决措施。

## 2 形态、结构和生活史

### 2.1 形态和结构

*P. piscicida* 在大西洋中部和美国东南部河口及近岸区域都已被发现。该藻是多形态



图1 *P. piscicida*三个主要生活期的形态(引自Steidinger, 1996)

Fig.1 *P. piscicida* at three main life stages (From Steidinger, 1996)

1) Zhou M J, Li J, Lucas B *et al.*, 1999. A recent shellfish toxin investigation in China. *Mar Pollut Bull* (in press)



## 2.2 生活史(图 2)

在无鱼的水中,该藻摄食其它藻类,无毒;当鱼群经过时,鱼体短暂存在的分泌物或排出物就足以激发该藻产生毒素。阿米巴期细胞、鞭毛期细胞、游动孢子都能转化为有毒的细胞,它们向鱼群游去,释放出毒素使鱼昏迷而无法游走;这些毒素继续损伤鱼的皮肤,使鱼由于流血而无法保持体内的盐平衡,又进一步发生皮肤溃疡和大出血。一旦鱼的活力丧失,*P. piscicida* 就开始摄食鱼脱落的上皮组织、血和其它伤口流出物。鱼死后,*P. piscicida* 的鞭毛期细胞就转化为阿米巴期细胞,继续摄食鱼的剩余部分;如果在营养盐丰富、有足够藻类摄食的水体中,鞭毛期细胞就会转化为无毒的游动孢子;如果环境不利(如大风暴突来),细胞的外面就会形成一层保护层,沉到水底变为休眠孢子。所有这些变化可在仅仅几小时内全部完成 (Burkholder *et al.*, 1995b)。

## 3 对海洋生物的影响

*P. piscicida* 和类似种对鱼的毒性很强,密度为 250—300cells/ml 的急性作用或 100cells/ml 以下的慢性作用都能引发鱼皮肤溃疡;400—2000cells/ml 的鞭毛期细胞即使健康的罗非鱼 (*Tilapia*) 在 20min 内死亡。

*P. piscicida* 对 32 种硬骨鱼和贝类都有类似的致死作用,据统计,在北卡罗莱那州的鱼类大规模死亡事件中,有 52.7% 由它造成。该藻能抑制鱼卵的孵化和幼鱼的生长,在低密度慢性影响作用下,会严重损害鱼的免疫系统,影响鱼种群数量。贝类和蟹类对这种藻有明显的回避反应,在由该藻引起的鱼类死亡区域,经常发现蟹试图离开有毒水体,并且蟹壳大面积受到损伤,被“吃掉”了。在实验室的生物测试中发现,该藻的密度在 1 000cells/ml 以上时,对所有测试贝类有致死作用;密度为 100—1 000cells/ml 时,对贝类有慢性毒性作用,使滤食率降低,丧失开闭壳能力等。但该藻对两种浮游动物——轮虫 (*Brachionus plicatilis*) 和桡足类 (*Acartia tonsa*) 短期 (3d) 和长期 (10d) 的存活繁殖无明显影响,且能被摄食 (Mallin *et al.*, 1995)。

## 4 毒素及检测方法

*P. piscicida* 的毒素由水溶性和脂溶性两部分组成。水溶部分具有神经毒性 (neurotoxicity), 对几种细胞株,包括 GH4C1 鼠垂体细胞 (rat pituitary cells)、N2A 小鼠脑胚细胞 (mouse neuroblastoma cells) 都有细胞毒性,但对钠通道和钙通道无激发和抑制作用,该毒素具有热稳定性 (75℃, 2h), 其毒素化学行为及其致毒机理明显不同于其它已知藻毒素 (McCellan-green *et al.*, 1997)。毒素浓缩后的提取物具低分子量 (200—1800), 致毒效应更快,2—3s 使鱼垂死,3min 以内可致鱼死亡。该毒素在几小时内能诱导 C-fos 报告基因 (reporter gene), GH4C1 报告基因法是目前最灵敏的在水样中检测毒素的方法,检出限为四个藻细胞 (高毒品系)。利用粒径排阻 (size exclusion) 和 C18 反相色谱 (reverse phase chromatography) 分离得到的相应色谱成分也具有相同的鱼毒作用、细胞毒性和基因表达,表明这些现象是由同样的化学成分引起的。脂溶部分具有“Noga 毒素” (Nogatoxin), 主要损伤鱼表皮,引起疱疹溃疡<sup>1)</sup>。

1) Burkholder J M, Glasgow H B, 1999. *Pfiesteria piscicida* and other *Pfiesteria*-like dinoflagellate in the mid-Atlantic and southeastern United States. Aquatic Botany Laboratory, North Carolina State University. Personal Communication

对 *P. piscicida* 的毒素检测较为困难。首先,其具有多变的生活史,作为“潜伏杀手”的有毒形态存在的时间很短,所以采样须在鱼死亡时的恰当时机进行,但即使这样,采样得到的藻量往往还是相对较少,一般占水体藻总量的 5%—10%。其次,该藻的形态与其它几种常见无毒藻类似,其本身不含叶绿体,一般无色或呈浅棕色;但有时可摄食其它藻类,得到一些“偷来的叶绿体”(cleptochloroplastes)而含色素,不易辨认。因此,Toffer 等(1998)从培养的藻中提取并利用 PCR 技术扩增 SSrDNA,测序后设计试验了一套特异 PCR 引物或探针,建立了针对这种藻的快速分子生物学检测方法。

## 5 环境适应性

*P. piscicida* 具有广温性(11—33℃)和广盐性(2—55)。最适温度为 26℃ 或更高一些,最适盐度为 15。对光有普适性,24h 周期内均能对鱼产生致死作用。生活史方面,一般在鱼垂死阶段,温度高于 15℃ 时,鞭毛期细胞较多;而在鱼死后,水冷一些时,阿米巴期细胞数量较多;条件不适时又可转为孢囊期。

营养盐对该藻的影响较复杂,与季节、食物类型、食物丰富度和摄食史等有关。无机磷能直接促进有毒游动孢子的产生,而整个生活周期无论有毒期和无毒期,该藻能直接吸收溶解有机氮。无机氮和无机磷往往通过促进无毒孢子的食物藻类的生长而产生间接促进作用,当游动孢子在细胞内保留了摄食来的叶绿体后,无机盐就能直接带来影响。由于富营养盐与人类和动物的排污有密切的联系,所以在离排污口近的地方确实发现该藻的数量明显增多。因此,在许多水冲刷交换较慢的河口,营养盐丰富,鱼和该藻之间有充足的时间进行“信息交换”(鱼产生分泌物,激发该藻产生鱼毒素),是该藻的理想栖息地。针对这一点,美国政府环保部门正在讨论如何控制农业化肥的使用量以减少营养盐的输入,来控制这种藻的生长,从而减轻灾害(Bukholder *et al.*, 1995a)。

## 6 对人类健康的影响

因为在实验室工作中接触了 *P. piscicida* 毒素,目前美国的几家实验室中已有 13 人健康受到不同程度的损害。其中,北卡罗莱那州立大学水生植物实验室的 Burkholder 博士等人由于直接接触了有毒藻培养液或从空气中吸入毒素后而受到影响。这种影响是在不知不觉中慢慢发生的,通常每天工作 1—2h 的人,数周后才表现出中毒症状。中毒症状有的类似哮喘,有的手脚刺痛麻木,眼睛灼热、视力模糊,胃痉挛、恶心、呕吐,皮肤溃疡,但对抗生素无反应,愈合很慢;更严重的会短暂失去记忆,思考和推理能力受损,如忘记熟悉的人名,阅读困难,不会简单算术(1 + 2)等(Levin *et al.*, 1997a)。研究表明,将藻类粗提取物给鼠进行皮下注射,可诱发鼠严重的学习障碍和记忆丧失(Levin *et al.*, 1997b)。中毒人员停止接触毒素后,大部分症状能完全好转,但对人体以后的免疫机能是否有影响还需作进一步研究。因此,该藻对公众,特别是渔民和水上运动者的健康存在一定的威胁。

## 7 应急反应

美国政府环保部门、大学以及研究机构都成立了针对该藻的应急反应组,调查采样跟踪 *P. piscicida* 赤潮。主要措施是:当鱼、贝死亡在不断发生时,观察鱼死亡附近海域的水色是否发生了变化,鱼是否有异常行为,即在短时间内“突然死亡”,或怀疑是毒藻引起的其它症状。每天至少两次检查这些信息。采集的水样可用酸性鲁哥试剂(Lugol)固定,尽量赶到鱼正在大量死亡的区域采样。如果恰好没有固定剂,可采集新鲜水样后置于阴凉

室温下保存。在实验室中 24h 内即可检测出水样中是否有该藻或其它有毒赤潮藻,但其毒性通常还需数天或数周来确定。

## 8 结语

美国科学家认为该藻的有毒爆发实际上是近岸海域环境恶化的一个标志,如何采取实际有效的措施来保护海域水质和人类健康,已成为迫在眉睫的问题。中国具有爆发这种“潜伏杀手”有毒赤潮的可能性,中国海域与美国东部海域在地理环境、气候环境和海流状况等方面有着很多相似之处,都处在大陆的东缘,气候温和,有大江大河注入,附近有暖流通过,有利的环境为该藻的滋生提供了条件。近年来,随着经济的发展,繁忙的海运、海域富营养化加剧,也为该藻的长途迁移和生存提供了方便而有可能已“不知不觉地”潜伏下来。中国近年常发生一些不明原因的鱼、虾、贝死亡事件,其中有一些是否与该藻有关尚不清楚。由于中国还未开展该藻的研究与监测,所以目前还无法确定 *P. piscicida* 藻种是否在中国存在,是否正在造成危害,因此今后如何采取应急措施有待研究。作者希望通过本文引起有关方面的重视,迅速采取行动,开展针对 *P. piscicida* 及其类似种的专项研究。

## 参 考 文 献

- Burkholder J M, Noga E J, Hobbs C W *et al*, 1992. New 'phantom' dinoflagellate is the causative agent of major estuarine fish kills. *Nature* (Lond.), 358:407—410
- Burkholder J M, Glassgow H B, Hobbs C W, 1995a. Fish kills linked to a toxic ambushpredator dinoflagellate: distribution and environmental conditions. *Mar Eco Prog Series*, 124:43—61
- Burkholder J M, Glassgow H B Jr, Steidinger K A, 1995b, Stage Transformation in the Complex Life Cycle of an Ichthyotoxic 'Ambush Predator' Dinoflagellate. In: Lassus P, Arzul G, Erard-Le Denn E *et al* ed. *Harmful Marine Algal Blooms*. Paris: Lavoisier, 567—572
- Burkholder J M, Glasgow H B Jr, 1995c. Interactions of a toxic estuarine dinoflagellate with microbial predator and prey. *Archiv Protistenk*, 145: 177—188
- Glasgow H B Jr, Lewitus A J, Burkholder J M, 1998. Feeding Behavior of the Ichthyotoxic Estuarine Dinoflagellate, *Pfiesteria piscicida*, on Amino Acids, Algal Prey and Fish Vs. Mammalian erythrocytes. In: Reguera B, Blanco J, Fernandes M *et al* ed. *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1998, 394—397
- Landsberg J H, Steidinger K A, Blakesley B, 1995. Fish-killing Dinoflagellates in a Tropical Marine Aquarium. In: Lassus P, Arzul G, Erard-Le Denn E *et al* ed. *Harmful marine Algal Blooms*. Paris: Lavoisier, 65—70
- Levin E D, Schmechel D E, Glasgow H B Jr *et al*, 1997a. Cognitive effects seen in rats exposed to the dinoflagellate *Pfiesteria*. *The toxicologist*, 36:62
- Levin E, Schmechel D E, Burkholder J M *et al*, 1997b. Persisting learning deficits in rats after exposure to *Pfiesteria piscicida*. *Envir Health Persp*, 105(12):1 320—1 325
- Lewitus A J, Burkholder J M, May E, 1995. Discovery of the 'phantom' Dinoflagellate in Chesapeake Bay. *Estuaries*, 18(2):373—378
- Mallin M A, Burkholder J M, Larsen L M *et al*, 1995. Response of two zooplankton grazers to an ichthyotoxic estuarine dinoflagellate. *J Plankton Research*, 17:2 351—2 363
- McCellan-green P D, Noga E, Baden D *et al*, 1997. Cytotoxicity of a purative toxin from the *Pfiesteria piscicida* dinoflagellate. *The Toxicologist*, 36:276

- Noga E J, Khoo L, Stevens J B *et al*, 1988. Novel toxic dinoflagellate causes epidemic disease in estuarine fish. *Mar Pollut Bull*, 11:143—170
- Qi Y Z, Hong Y, Zheng L *et al*, 1996. Dinoflagellate cysts from recent marine sediments of the south and east China seas. *Asian Mar Biol*, 13:87—103
- Smayda T J, 1992. A phantom of the ocean. *Nature*, 358:374—375
- Steidinger K A, 1996. *Pfiesteria piscicida* gen. *et* sp. nov. (Pfiesteriaceae fam. nov.), a new toxic dinoflagellate with a complex life cycle and behavior. *J Phycol*, 32:157—164
- Toffer K, Schaefer E, Glasgow H Jr *et al*, 1998. Ribosomal DNA From the Toxic Dinoflagellate *Pfiesteria piscicida*. In: Reguera B, Blanco J, Fernandes M *et al*, ed. *Harmful Algae Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1998*, 278—279
- Tseng C K, Zhou M J, Zou J Z, 1993. Toxic Phytoplankton Studies in China. In: Smayda T J, Shimizu Y ed. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B V, 347—352

## REVIEWS OF STUDIES ON TOXIC DINOFLAGELLATE *PFIESTERIA PISCICIDA*

YAN Tian, ZHOU Ming-jiang, ZENG Cheng-kui (C. K. Tseng)

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

**Abstract** An increasing attention has been paid to a popularly called “ambush predator”, new species of toxic dinoflagellate, *Pfiesteria piscicida* Steidinger *et* Burkholder sp. nov., due to its “phantom-like” behavior and impacts of causing massive fish killing on the east coast of U. S. A. *Pfiesteria piscicida* was first discovered in 1988 in fish cultures at the North Carolina School of Veterinary Medicine. It was found to represent a new family, genus and species. It has a complex life cycle in which it transforms among an array of at least 24 flagellated, amoeboid and encysted stages. When fish swim into an area and linger to feed, their excreta triggers encysted cells to emerge and become toxic. When the fish die, flagellated stages transformed to amoeboid stages or dormant cyst stages in a short period of time. *P. piscicida* has been also linked to serious human health impacts. The effects include a suite of symptoms such as narcosis, development of sores, severe headaches and cognitive impairment. Both water-soluble and lipid-soluble toxic fractions for *P. piscicida* are known. This paper introduces studies on its structure, life cycle, behavior, toxins, impact on marine organisms and human health, as well as field response action taken toward it. Since the Chinese coast has similar geographic position and climate conditions to the eastern U. S. A., and many mariculture failures occurred in recent years for unknown reasons, the existence of this “phantom-like killer” in Chinese waters should be taken into consideration.

**Key words** Red tide Dinaflagellate *Pfiesteria piscicida*

**Subject classification number** X171