

卡罗藻有毒株与无毒株对菲律宾蛤仔的生长、存活及生理生化影响

吴廷华¹, 郭 贺², 梅丽敏¹, 潘渊博¹, 徐建峰³, 周成旭^{1,4*}

(1. 宁波大学 食品与药学学院, 浙江 宁波 315832; 2. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315832; 3. 福建省连江县水产技术推广站, 福建 连江 350500; 4. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315832)

摘要: 剧毒卡罗藻对双壳类生理生化过程的影响尚待研究阐明。本文以菲律宾蛤仔为对象, 比较研究了细胞大小形态一致的剧毒卡罗藻和无毒周氏卡罗藻对菲律宾蛤仔的生长、存活、摄食生理以及糖原含量的影响。结果显示, 2 种卡罗藻喂养下, 菲律宾蛤仔稚贝均有生长, 但有毒组的生长指标和存活率均显著低于无毒组。其滤水率和摄食率与藻密度呈近似幂函数相关, 15×10^5 cells·L⁻¹ 为拐点藻密度; 小于或等于此藻密度时, 2 组的摄食率和滤水率随密度增加而增加, 且无显著差异; 大于此密度时, 有毒藻组滤水率和摄食率均显著低于无毒藻组。成贝较稚贝能耐受更高有毒藻密度。摄食 2 种卡罗藻后, 菲律宾蛤仔各组织均快速累积糖原, 外套膜糖原含量最高, 变化最为显著。但糖原累积量与藻密度有关, 低藻密度组中, 有毒藻组的糖原含量显著低于无毒藻组。研究表明, 剧毒卡罗藻可以通过降低贝类摄食能力、干扰生化代谢等非急性致死过程来影响贝类的生长及存活。

关键词: 剧毒卡罗藻; 周氏卡罗藻; 菲律宾蛤仔; 摄食; 糖原存储

中图分类号: Q89

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2022) 05-0019-08

微藻是滤食性贝类的重要食物来源, 其组成结构影响着养殖贝类的产量和品质^[1-5]。有毒有害微藻存在时, 贝类可能减少或避免摄食^[6-7], 生长率下降, 甚至死亡^[8-9]。

甲藻是海洋微藻的主要类群之一, 有些种类具有明确的毒素, 而有些种类没有毒素。卡罗藻属 (*Karlodinium*) 是一类沿海养殖水域广泛分布的小型裸甲藻^[10-13]。其中, 剧毒卡罗藻 (*Karlodinium veneficum*) 能分泌卡罗藻毒素 (Karlotoxins)^[13-15], 具有多种毒性特征, 在全球各大洲沿海水域赤潮时, 能致死养殖生物^[16-21]。周氏卡罗藻 (*Karlodinium zhouanum*) 是一种无毒的卡罗藻^[22], 与剧毒卡罗藻具有一致的细胞大小和形态特征。2 种卡罗藻在中国南北沿海水域均有广泛分布^[22-23]。在早期研究中, 由于卡罗藻细胞微小, 常规镜检方法不易检出

而常被忽视。近年来在我国沿海水域, 卡罗藻属种的分布和生物量上升, 赤潮发生并致害事件也呈增加趋势^[19,24-25], 对生态环境和不同海水养殖生物的影响还需大量研究。对有毒甲藻毒素的食物链累积、致害机制、赤潮时的生态效应等研究较多, 但对非赤潮密度时的作用以及对有毒和无毒甲藻类影响贝类生长、生理生化代谢的比较等方面研究尚存不足。

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 是典型滤食性双壳贝类, 在我国沿海滩涂分布广泛, 是重要养殖物种, 其养殖规模和产量均位列前茅^[26]。由于滤食性贝类的摄食受到食物颗粒形态、大小等的影响, 在以摄食率和滤水率等摄食生理指标为研究目标时, 以颗粒大小、形态一致的藻种做比较研究为宜。本文以菲律宾蛤仔为研究对象, 比较分析产

收稿日期: 2021-11-10.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0900702); 科技基础资源调查专项 (2018FY100206)。

第一作者: 吴廷华 (1997-), 男, 安徽怀宁人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 双壳贝类的代谢。E-mail: fireworks555@163.com

*通信作者: 周成旭 (1968-), 女, 四川什邡人, 研究员, 主要研究方向: 微藻生物技术。E-mail: zhouchengxu@nbu.edu.cn

毒和不产毒卡罗藻对菲律宾蛤仔生长、存活、摄食生理的影响及其差异,并对不同组织中的糖原含量在摄食前后的变化特征进行解析.研究的主要目的:(1)比较2种细胞颗粒大小、形态完全一致的有毒和无毒甲藻对菲律宾蛤仔生长及生理生化的影响;(2)初步探究卡罗藻属种对菲律宾蛤仔潜在的影响效应机制.研究结果可为评价该属种赤潮甲藻对双壳类养殖生产的影响提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 卡罗藻藻种

2种卡罗藻均分离自东海养殖水域,为宁波大学微藻种质库保存藻种,分别为有毒的剧毒卡罗藻(库存编号NMBjah047-1,株系编号GM2)和无毒的周氏卡罗藻(NMBjah056-9,株系编号GM17).藻种扩大培养至足量以用于实验.

1.2 有毒和无毒卡罗藻对菲律宾蛤仔稚贝生长和存活的影响

菲律宾蛤仔稚贝采自于福建宁德育苗场,平均壳长约(2.62±0.19)mm,壳高约(2.16±0.18)mm.在实验室暂养期间,投喂球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*),隔天换水,连续充气.

生长实验前,以筛网筛取大小均匀的稚贝.在白色塑料方盆中加入5L过滤海水(盐度25),均匀撒入2g的稚贝.分为2组,各组3平行,投喂有毒或无毒卡罗藻.每天定时投喂2次(8:00和20:00),每次投喂使水体中的藻密度约为 $2 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ cells·L⁻¹.充气培养,隔天更换海水,同时随机取稚贝于显微镜下测量10粒活贝的壳长和壳高,计算其相对规格大小(壳长×壳高,mm²),测量完成后,稚贝放回对应实验组.

稚贝相对生长率 $R = (S_t - S_{t-1}) / S_{t-1} \times 100\%$,式中, S_t 为 t 时间点的规格大小, S_{t-1} 为 t 时间点前一个采样时间点的规格大小.

投喂9d后,各组分别随机取样,计数100粒稚贝,其中空壳记为死亡个体,以计算存活率,重复3次计数.

1.3 有毒和无毒卡罗藻对菲律宾蛤仔滤水率和摄食率的影响

1.3.1 成贝摄食率和滤水率

成贝取自福建定海湾贝类养殖基地,选取健

康活力好的个体,放入塑料盆中驯养1周,以球等鞭金藻投喂.驯养期间每天换水1次.实验前,放入抽滤海水中饥饿24h.实验用成贝平均规格大小即壳长、壳宽、壳高分别约为33、22、14mm,湿重约(6.6±0.6)g.

预实验确定菲律宾蛤仔摄食2种微藻在1h内不产生假粪的最大藻密度,以排除藻密度过高造成贝类形成假粪的影响.正式实验时,设置藻密度梯度为 10×10^5 、 15×10^5 、 20×10^5 、 25×10^5 、 30×10^5 cells·L⁻¹,各密度组投放3个成贝,不投放菲律宾蛤仔的对应藻密度组为无摄食对照组.水体体积1L,各组3平行.实验于控温培养室(23±2)℃进行,海水盐度25,pH值7.82.

经1h后,取2mL各实验组藻液,以20μL鲁哥氏碘液固定,用浮游计数框计数藻细胞密度.

贝类滤水率和摄食率计算公式如下^[27-28]:

$$V_{FR} = \ln((C_0 - C_0S) / C_t) V / (nt), \quad (1)$$

$$S = (C_1 - C_2) / C_1, \quad (2)$$

$$I_{IR} = C_t V_{FR}, \quad (3)$$

式中: V_{FR} 为一个菲律宾蛤仔(shell)单位时间(h)的滤水体积(滤水率, L·(shell·h)⁻¹); V 为藻液体积(L); n 为菲律宾蛤仔数目(个); t 为试验持续时间(h); C_0 、 C_t 分别为实验起始和 t 时间的微藻密度(cells·mL⁻¹); S 为无摄食对照组微藻的变化系数; C_1 和 C_2 分别为对照组起始和 t 时间后的微藻密度(cells·mL⁻¹); I_{IR} 为一个菲律宾蛤仔(shell)单位时间(h)摄食的藻细胞数(摄食率, cells·(shell·h)⁻¹).

1.3.2 稚贝摄食率和滤水率

稚贝材料与生长实验相同.实验前,将稚贝于抽滤海水中饥饿24h.摄食实验时,设置卡罗藻密度梯度 5×10^5 、 10×10^5 、 15×10^5 、 20×10^5 、 25×10^5 cells·L⁻¹,藻液体积1L,各密度组放入2g稚贝,不加稚贝的对应藻密度组为无摄食对照组,各组3平行.实验与成贝相同环境下进行.1h后,各实验组取2mL藻液,以20μL鲁哥氏碘液固定,浮游植物计数框计数藻密度.稚贝滤水率和摄食率计算同成贝,其中,贝类生物量为质量(g),因此,稚贝滤水率和摄食率单位分别为L·(g·h)⁻¹和cells·(g·h)⁻¹.

1.4 菲律宾蛤仔摄食有毒和无毒卡罗藻时各组织糖原的变化

利用成贝摄食实验的贝类样品进行分析.摄

食实验结束后, 取摄食前以及3组不同藻密度(10×10^5 、 20×10^5 、 30×10^5 cells·L⁻¹, 记为低、中、高密度)实验组的成员, 置于冰面上及时解剖, 取闭壳肌、外套膜、足、肝胰腺组织, 将各组3只菲律宾蛤仔的相同组织分别混合后, 置于-80℃冰箱保存, 待测其糖原。

糖原含量采用蒽酮比色法测定^[29]。精确称取待检组织各100 mg, 加入8 mL 5%(体积百分比)三氯醋酸, 匀浆1 min, 以3 000 r·min⁻¹离心匀浆液15 min, 取1 mL上清液放入10 mL离心管中, 加入4 mL 95%(体积百分比)乙醇, 将试管放置在37~40℃水浴锅中水浴加热3 h。沉淀完全后, 3 000 r·min⁻¹离心15 min, 弃上清液, 离心管倒立放置10 min。加入1 mL蒸馏水溶解糖原后, 加入5 mL蒽酮硫酸试剂, 搅拌均匀, 沸水浴中反应15 min(反应液呈蓝绿色)后, 在流水下迅速冷却以停止反应。以酶标仪测定620 nm吸光值。根据标准曲线计算糖原含量。

标准曲线制定: 配制葡萄糖质量浓度梯度为0.2、1.0、1.8、2.6、3.4、4.2、5.0 mg·mL⁻¹的工作溶液各1 mL, 加入5 mL蒽酮硫酸试剂, 沸水浴15 min, 取出后迅速于流水下冷却以停止反应。酶标仪测定620 nm吸光值。以1.0 mL蒸馏水同样方式操作, 作为空白对照。

1.5 数据统计分析

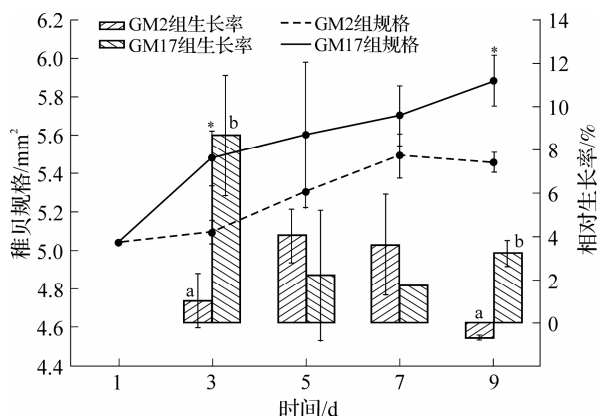
结果数据以“平均值±标准偏差”表示。SPSS 19.0对实验组间结果进行One-Way ANOVA单因子方差分析。显著水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 有毒和无毒卡罗藻对菲律宾蛤仔稚贝生长和存活的影响

2组甲藻投喂菲律宾蛤仔, 其大小变化如图1所示。在相同的策略下投喂9 d后, 相对于初始规格, 无毒藻组(GM17)和有毒藻组(GM2)分别增长了 $16\% \pm 2.6\%$ 和 $8\% \pm 1\%$ 。由图可见, 在投喂初期(1~3 d)和后期(7~9 d), 每2 d的相对增长率均呈现GM17组显著大于GM2组($P < 0.05$), 大小规格也是GM17组显著大于GM2组($P < 0.05$)。在第5天和第7天时, 2组的规格大小和相对增长率没有显著差异($P > 0.05$)。

从稚贝存活结果来看, 在相同投喂策略下, 稚



*表示组间差异显著性($P < 0.05$), a 和 b 表示增长率组间的差异显著性($P < 0.05$), 下同。

图1 GM2和GM17投喂下稚贝的规格和相对增长率

贝生长8 d后, GM17组存活率约 $76.3\% \pm 3.2\%$, GM2组约为 $58.0\% \pm 2.6\%$, 有毒组显著低于无毒组($P < 0.05$)。

2.2 有毒和无毒卡罗藻对菲律宾蛤仔成贝的滤水率和摄食率的影响

由图2可见, 在2种卡罗藻液中, 菲律宾蛤仔的滤水率随藻密度增加而增加, 在出现最大滤水率后, 滤水率下降。GM2组中, 最大滤水率为 (0.28 ± 0.03) L·(shell·h)⁻¹, 出现在藻密度为 15×10^5 cells·L⁻¹的实验组; GM17组中, 最大滤水率为 (0.46 ± 0.03) L·(shell·h)⁻¹, 出现在藻密度较高的实验组(20×10^5 cells·L⁻¹)。GM17组滤水率均大于GM2组。在最低实验藻密度组中(10×10^5 cells·L⁻¹), GM2组滤水率已出现显著低于GM17组($P < 0.05$)。除藻密度为 15×10^5 cells·L⁻¹的实验组以外($P > 0.05$), 在其他更高密度下, GM2组滤水率均显著低于GM17组滤水率($P < 0.05$)。

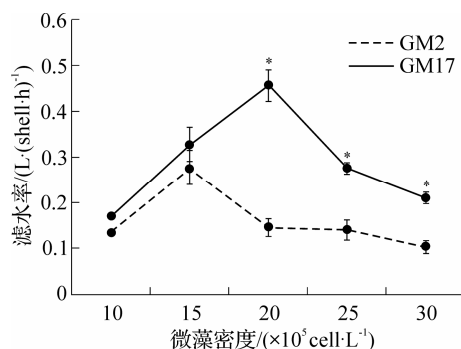


图2 不同密度的GM2和GM17中成贝的滤水率

菲律宾蛤仔摄食率与藻密度的相关特征如图3

所示. 较低藻密度中($10 \times 10^5 \sim 15 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$), 2组贝类摄食率相同. 当藻液密度大于 $15 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 随着藻密度增加, 摄食率出现差异. 与滤水率不同, 实验藻密度范围内, 摄食率未出现增加至最大值后下降的趋势. GM17 组摄食率随藻密度增加而增加. GM2 组中摄食率增加幅度降低, 各密度下, 其摄食率均显著低于 GM17 组摄食率($P < 0.05$).

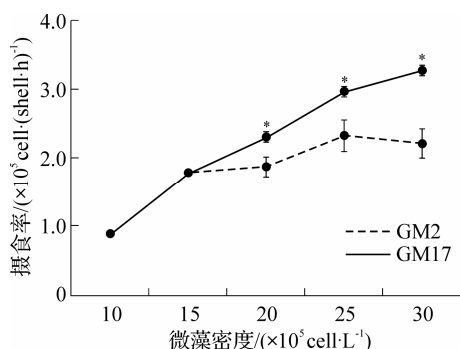


图3 不同密度的 GM2 和 GM17 中成贝的摄食率

2.3 有毒和无毒卡罗藻对菲律宾蛤仔稚贝摄食率和滤水率的影响

稚贝滤水率和摄食率与卡罗藻密度相关, 藻密度小于 $15 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 滤水率和摄食率随藻密度增加而增加(图4和图5); 与成贝不同, 稚贝摄

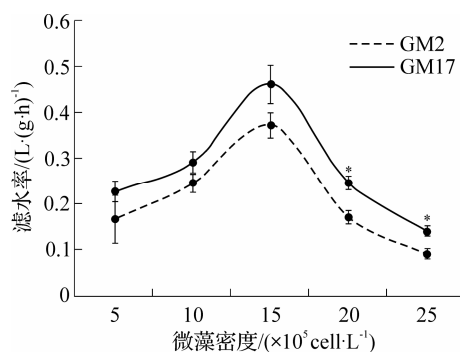


图4 不同密度的 GM2 和 GM17 中稚贝的滤水率

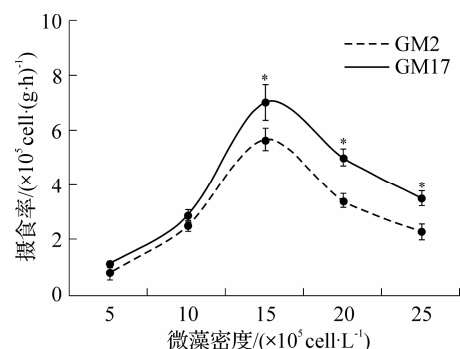


图5 不同密度的 GM2 和 GM17 中稚贝的摄食率

食率和滤水率均在相同藻密度($15 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$)达到最大. 无毒藻组(GM17)中, 最大滤水率和摄食率分别为 $(0.46 \pm 0.04) \text{ L} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ 和 $(7.00 \times 10^5 \pm 0.63 \times 10^5) \text{ cells} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$; 有毒藻组(GM2)中, 分别为 $(0.37 \pm 0.02) \text{ L} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ 和 $(5.65 \times 10^5 \pm 0.41 \times 10^5) \text{ cells} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$. 藻密度进一步增加($> 15 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$)时, 滤水率和摄食率均下降, 并在2种藻液中具有相同下降特征, 呈现幂函数相关特征. 当藻密度低于 $15 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 2组滤水率和摄食率无显著差异($P > 0.05$). 藻密度大于 $15 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 以后, GM2 组滤水率和摄食率均显著低于 GM17 组($P < 0.05$).

2.4 摄食有毒和无毒卡罗藻时菲律宾蛤仔成贝各组织糖原的变化

糖原含量分析的工作曲线如图6所示. 实验检测的 OD 值范围内, 糖原量与吸光值的关系式为:

$$y = 0.1344x - 0.0054, R^2 = 0.9931,$$

式中: y 为 $\text{OD}_{620\text{nm}}$; x 为糖原量($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

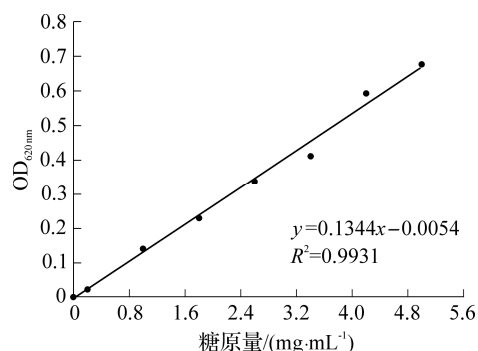


图6 糖原量分析的工作曲线

摄食前以及低、中、高藻密度组摄食1h后, 菲律宾蛤仔各组织糖原含量结果如图7所示. 不同组织糖原含量水平不同, 其中, 外套膜具有最高糖原相对含量(约 $640 \sim 1890 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 其次为足(约 $140 \sim 600 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)和闭壳肌(约 $100 \sim 220 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 肝胰腺糖原相对含量最低(约 $18 \sim 60 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). 除高藻密度下 GM2 组的外套膜和闭壳肌糖原含量与未摄食组没有显著差异外($P > 0.05$)(图7(a)、(c)), 摄食后, 组织中的糖原均出现显著增加($P < 0.05$). 摄食1h后, GM17 低藻密度组外套膜中糖原含量最高, 且显著大于 GM2 低藻密度组($P < 0.05$); 中、高藻密度组中, GM17 和 GM2 糖原含量没有显著差异($P > 0.05$)(图7(a)). 足的低藻密度组中, GM17 组和 GM2 组的糖原含量没有显著差异($P > 0.05$), 高密度组中, GM2

组显著低于 GM17 组 ($P < 0.05$) (图 7(b)). 各藻密度组的闭壳肌和肝胰腺中 (图 7(c)、(d)), GM17 和 GM2 组的糖原含量均未呈现显著差异 ($P > 0.05$).

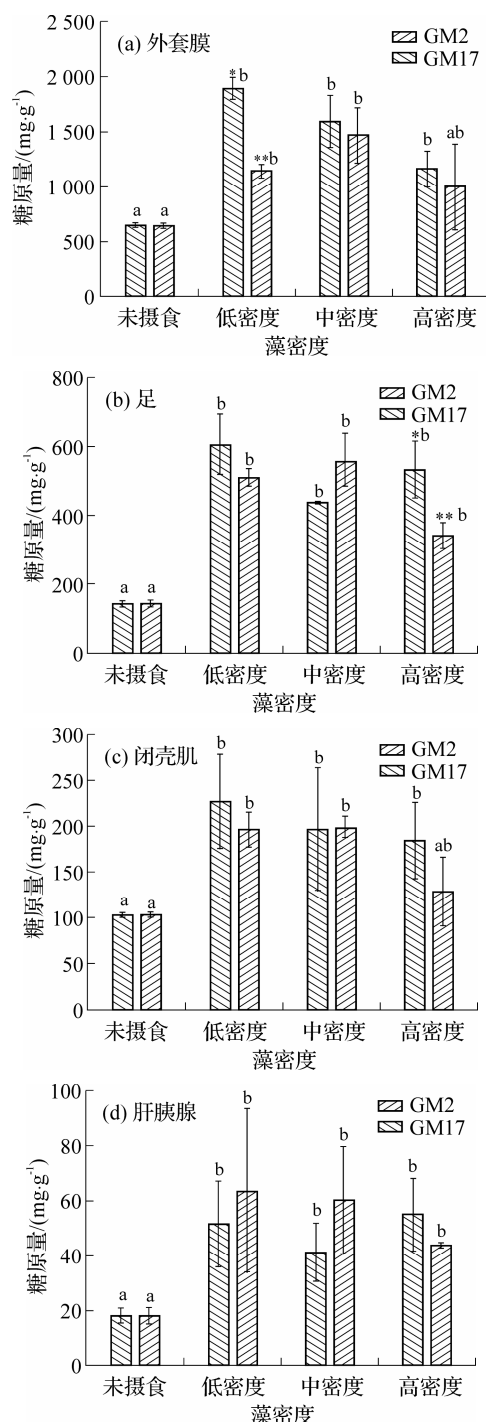


图 7 菲律宾蛤仔摄食不同密度 GM2 和 GM17 后各组织的糖原量

研究结果显示, 有毒和无毒卡罗藻对菲律宾蛤仔生长、存活以及摄食生理产生了不同的影响。

有毒种使菲律宾蛤仔生长和存活率显著降低, 并使其滤水率和摄食率显著下降, 与藻密度相关性发生变化, 且对菲律宾蛤仔软组织糖原的存储和组织间分布产生了影响。

3 讨论

滤水率和摄食率是反映贝类摄食生理的重要指标^[30]。环境颗粒物的大小、密度、形态、生化成分等都是影响贝类摄食生理的重要因子^[2-5], 摄食有毒有害颗粒物时, 贝类生长、存活及摄食生理代谢等方面会发生显著改变^[6-7]。本研究显示, 在细胞大小、形态和投喂策略完全一致的情况下, 2 种卡罗藻对菲律宾蛤仔成贝摄食生理产生了显著不同的影响, 与其含毒与否显著相关。Binzer 等^[9]就卡罗藻属另一有毒种(*K. armiger*)对紫贻贝(*Mytilus edulis*)成贝的影响研究发现, 相对于贝类喜食的无毒隐藻对照组, 贻贝在卡罗藻藻密度大于 1.5×10^6 cells·L⁻¹ 时, 开始避免滤食(相当于本文中成贝实验密度 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells·L⁻¹); 密度约为 3.6×10^7 cells·L⁻¹ 时(大于本文中成贝实验密度 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells·L⁻¹), 贻贝在 24 h 和 48 h 出现不同程度的死亡。塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarensis*)也是一种赤潮甲藻, 具有有毒和无毒生态型, 不同双壳贝类的摄食活动对该藻的响应不同, 且与海域相关^[31]; 不同贝类摄食生理受到不同影响时, 有滤水率升高的, 也有降低的; 而有的贝类可能发展了某种适应机制, 能够适应此赤潮种类, 而没有受到任何不利影响^[31]。本研究中, 从摄食率响应藻密度增加的变化关系来看, 菲律宾蛤仔成贝较稚贝对高密度卡罗藻具有更高的耐受力。高藻密度影响下, 其摄食率未下降, 但稚贝摄食率显著下降。虽然不同微藻对养殖生物的影响效应不能在绝对细胞密度上进行比较, 且贝藻相互作用关系具有种类特异性^[32]。但研究结果均显示, 产毒甲藻对贝类的摄食生理过程产生了影响。本研究显示, 菲律宾蛤仔在摄食卡罗藻有毒和无毒种时, 其滤水率和摄食率始终是无毒组高于有毒组。可见其对于卡罗藻的无毒种和有毒种具有不同的摄食活力。但如果需要完全明确 2 种株藻共存时, 菲律宾蛤仔是否有偏爱滤食, 目前尚难以在实验中做到, 原因是此 2 种藻在显微镜镜检条件下无法进行区分。因此, 需要在今

后的研究中进一步提高外形无法区分的藻株识别技术,比如采用特异性的荧光标记或分子探针技术等,以明确其对有毒株和无毒株共存时摄食偏好问题。

2种卡罗藻在不同程度上支持菲律宾蛤仔个体生长,但生长率和存活率均显著不同,且摄食后,短期内即表现出糖原存储差异,说明有毒与无毒卡罗藻使菲律宾蛤仔在生化代谢层面上也发生了变化。糖原主要参与贝类的能量代谢^[33-34],其含量在生理代谢过程中变化迅速^[35-36],是评价贝类营养健康状况的重要指标。尚未见关于贝类摄食不同微藻短期内造成各组织糖原含量变化的报道。Galimany 等^[37]对剧毒卡罗藻影响紫贻贝贝苗的免疫功能和组织病理学变化进行了研究。投喂的剧毒卡罗藻终密度为 $(6.25 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1})$,小于本研究稚贝实验中的藻密度 $(2 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1})$,并且为每天1次投喂。投喂3d后,贝类已显示免疫功能受到影响,6d暴露后,血细胞释放活性氧增加。本研究中,菲律宾蛤仔摄食2种卡罗藻1h后,糖原含量均有不同程度的上升,说明在获得可摄食颗粒后,饥饿的菲律宾蛤仔迅速启动了糖原储存机制。并且低藻密度组的贝类摄食率和滤水率均没有显著差异,但有毒藻组外套膜糖原含量显著小于无毒藻组,说明在相同摄食率情况下,有毒卡罗藻可能对糖原存储和相关代谢过程产生了影响。Tatsuya^[38]研究发现,菲律宾蛤仔不同组织的糖原含量具有差别,外套膜糖原在生理活动中变化迅速。本研究结果显示,菲律宾蛤仔外套膜糖原含量最高,且与有毒和无毒卡罗藻的影响显著相关。在所有藻密度组中,肝胰腺和闭壳肌的糖原没有显示有毒和无毒组的差异,且其糖原含量相对低,也可能说明2个组织中的糖原代谢响应不如外套膜迅速。由于剧毒卡罗藻不仅细胞内含毒,且毒素释放到环境水体,还具有主动猎食多细胞动物的行为^[13],使其贝藻相互作用过程较为复杂。在高密度组中,可能在过高的藻密度及毒素的作用下,对菲律宾蛤仔不同组织及其他生理生化过程造成了影响,其机制尚待研究挖掘。但本研究显示,饥饿处理的菲律宾蛤仔可在摄入卡罗藻后,迅速储存糖原,说明2种甲藻提供了菲律宾蛤仔能量代谢的物质基础,但有毒种可能造成其糖原累积以及组织

间分布不同。

本研究结果显示,常以非赤潮密度分布于海水养殖水域中的剧毒卡罗藻可能通过影响滤食性贝类的摄食生理活动及糖原等生化代谢过程对贝类的生长和存活产生影响,在沿海养殖水域中剧毒卡罗藻生物量趋于增加的背景下,该藻对贝类养殖业的影响值得关注。

参考文献:

- [1] Dame R F. Bivalve Filter Feeders in Estuarine and Coastal Ecosystem Processes[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 1993.
- [2] Rosa M, Ward J E, Holohan B A, et al. Physicochemical surface properties of microalgae and their combined effects on particle selection by suspension-feeding bivalve molluscs[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2017, 486:59-68.
- [3] Hernroth B, Larsson A, Edebo L. Influence on uptake, distribution and elimination of *Salmonella typhimurium* in the blue mussel, *Mytilus edulis*, by the cell surface properties of the bacteria[J]. Journal of Shellfish Research, 2000, 19(1):167-174.
- [4] Ward J E, Targett N M. Influence of marine microalgal metabolites on the feeding behavior of the blue mussel *Mytilus edulis*[J]. Marine Biology, 1989, 101(3):313-321.
- [5] Newell R I E, Jordan S J. Preferential ingestion of organic material by the American oyster *Crassostrea virginica*[J]. Marine Ecology Progress Series, 1983, 13(1):47-53.
- [6] Riisgård H U, Kittner C, Seerup D F. Regulation of opening state and filtration rate in filter-feeding bivalves (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*) in response to low algal concentration[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2003, 284(1/2):105-127.
- [7] Rist S E, Assidqi K, Zamani N P, et al. Suspended micro-sized PVC particles impair the performance and decrease survival in the Asian green mussel *Perna viridis* [J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 111(1/2):213-220.
- [8] Lassudrie M, Hégaret H, Wikfors G H, et al. Effects of marine harmful algal blooms on bivalve cellular immunity and infectious diseases: A review[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2020, 108:103660.
- [9] Binzer S B, Lundgreen R B C, Berge T, et al. The blue mussel *Mytilus edulis* is vulnerable to the toxic dinoflagellate *Karlodinium armiger* — Adult filtration is inhibited and several life stages killed[J]. PLoS One, 2018, 13(6):e0199306.

- [10] Deeds J R, Terlizzi D E, Adolf J E, et al. Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (= *Gyrodinium galatheanum*) (Dinophyceae) — A dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility[J]. Harmful Algae, 2002, 1(2):169-189.
- [11] Garcés E, Fernandez M, Penna A, et al. Characterization of NW mediterranean *Karlodinium* spp. (Dinophyceae) strains using morphological, molecular, chemical, and physiological methodologies1[J]. Journal of Phycology, 2006, 42(5):1096-1112.
- [12] Lim H C, Leaw C P, Tan T H, et al. A bloom of *Karlodinium australe* (Gymnodiniales, Dinophyceae) associated with mass mortality of cage-cultured fishes in West Johor Strait, Malaysia[J]. Harmful Algae, 2014, 40:51-62.
- [13] Place A R, Bowers H A, Bachvaroff T R, et al. *Karlodinium veneficum* — The little dinoflagellate with a big bite[J]. Harmful Algae, 2012, 14:179-195.
- [14] Bachvaroff T R, Adolf J E, Squier A H, et al. Characterization and quantification of karlotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Harmful Algae, 2008, 7(4):473-484.
- [15] Cai P J, He S, Zhou C X, et al. Two new karlotoxins found in *Karlodinium veneficum* (strain GM2) from the East China Sea[J]. Harmful Algae, 2016, 58:66-73.
- [16] Kempton J W, Lewitus A J, Deeds J R, et al. Toxicity of *Karlodinium micrum* (Dinophyceae) associated with a fish kill in a South Carolina brackish retention pond[J]. Harmful Algae, 2002, 1(2):233-241.
- [17] Bjørnland T, Tangen K. Pigmentation and morphology of a marine *Gyrodinium* (Dinophyceae) with a major carotenoid different from peridinin and fucoxanthin[J]. Journal of Phycology, 1979, 15(3):457-463.
- [18] Benico G, Takahashi K, Lum W M, et al. The harmful unarmored dinoflagellate *Karlodinium* in Japan and Philippines, with reference to ultrastructure and micropredation of *Karlodinium azanzae* sp. nov. (Kareniaceae, Dinophyceae)[J]. Journal of Phycology, 2020, 56(5):1264-1282.
- [19] Cen J Y, Wang J Y, Huang L F, et al. *Karlodinium elegans* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a novel species isolated from the East China Sea in a dinoflagellate bloom[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2021, 39(1):242-258.
- [20] Dai X F, Lu D D, Guan W B, et al. Newly recorded *Karlodinium veneficum* dinoflagellate blooms in stratified water of the East China Sea[J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2014, 101:237-243.
- [21] Hallegraeff G, Dorantes-Aranda J J, Mardones J, et al. Review of progress in our understanding of fish-killing microalgae: Implications for management and mitigation [C]//International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2017.
- [22] Zhu X J, Zhou C X, Meng R, et al. Biochemical characteristics support the recently described species *Karlodinium zhouanum* (Gymnodiniales, Dinophyceae) [J]. Phycological Research, 2020, 68(1):14-22.
- [23] Huang H L, Shao Q W, Zhu X J, et al. Distribution of *Karlodinium veneficum* in the coastal region of Xiangshan Bay in the East China Sea, as detected by a real-time quantitative PCR assay of ribosomal ITS sequence[J]. Harmful Algae, 2019, 81:65-76.
- [24] Park T G, Kang Y S, Park Y T, et al. Detection of fish killing dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* and *Karlodinium veneficum* (Dinophyceae) in the East China Sea by real-time PCR[J]. Harmful Algae, 2009, 24(2): 105-110.
- [25] Xu X, Yu Z, Cheng F, et al. Molecular diversity and ecological characteristics of the eukaryotic phytoplankton community in the coastal waters of the Bohai Sea, China[J]. Harmful Algae, 2017, 61:13-22.
- [26] 国家统计局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [27] Coughlan J. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions[J]. Marine Biology, 1969, 2(4): 356-358.
- [28] 范嗣刚, 姜松, 黄桂菊, 等. 合浦珠母贝和大珠母贝稚贝摄食率及摄食节律的比较研究[J]. 水产科技情报, 2015, 42(1):6-10.
- [29] Carroll N V, Longley R W, Roe J H. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1956, 220(2): 583-593.
- [30] 付家想, 蓝文陆, 李天深, 等. 香港巨牡蛎对 3 种浮游植物摄食率和滤清率的研究[J]. 海洋学报, 2017, 39(8): 62-69.
- [31] Shumway S E, Cucci T L. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs[J]. Aquatic Toxicology, 1987, 10(1):9-27.
- [32] Shumway S E, Cembella A D. The impact of toxic algae on scallop culture and fisheries[J]. Reviews in Fisheries

- Science, 1993, 1(2):121-150.
- [33] Samain J F. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality [J]. Aquatic Living Resources, 2011, 24(3):227-236.
- [34] Hardie D G, Sakamoto K. AMPK: A key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle[J]. Physiology, 2006, 21(1):48-60.
- [35] Uzaki N, Kai M, Aoyama H, et al. Changes in mortality rate and glycogen content of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during the development of oxygen-deficient waters[J]. Fisheries Science, 2003, 69(5):936-943.
- [36] Carefoot T H, Qian P Y, Taylor B E, et al. Effect of starvation on energy reserves and metabolism in the Northern abalone, *Haliotis kamtschatkana*[J]. Aquaculture, 1993, 118(3/4):315-325.
- [37] Galimany E, Place A R, Jutson M, et al. The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis*[J]. Harmful Algae, 2008, 7(1):91-98.
- [38] Tatsuya Y. Seasonal changes in glycogen contents in various tissues of the edible bivalves, pen shell *Atrina lischkeana*, ark shell *Scapharca kagoshimensis*, and manila clam *Ruditapes philippinarum* in west Japan[J]. Journal of Marine Biology, 2015, 2015:1-5.

Effects on the survival, growth and physio-biochemical activity of *Ruditapes philippinarum* by toxic and non-toxic *Karlodinium* species

WU Yanhua¹, GUO He², MEI Limin¹, PAN Yuanbo¹, XU Jianfeng³, ZHOU Chengxu^{1,4*}

(1.College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China; 2.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China; 3.Aquaculture Technique Popularization Station of Lianjiang, Lianjiang 350500, China; 4.Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: How the dinoflagellate *Karlodinium veneficum* affect the growth and physio-biochemical metabolism of bivalves requires further research. In this study, two morphologically identical but of different toxicity species, namely the toxic *K. veneficum*, and the non-toxic *K. zhouanum*, were applied in the detection of their effects on the survival, growth, grazing activity and glycogen content of manila clam (*Ruditapes philippinarum*) juveniles or adults. The results show that both species support the clam for growth. But the growth and survival rates were significantly lower in the toxic algal group than those in the nontoxic one. Both filtration and ingestion rates changed along with the algal cell densities, resembling power function relationship in both algal groups. The algal density at the inflection point was 15×10^5 cells·L⁻¹. In algal groups of lower or equal to this density, the filtration or ingestion rates increased along with the increased algal density. There was no significant difference in two algal groups. When algal cell densities were equal to (or higher than) 15×10^5 cells·L⁻¹, the filtration and ingestion rates were significantly lower in toxic algal groups than those in non-toxic ones. The adult clam showed higher algal density tolerance than the juveniles. The glycogen contents in the starving adult clam increased rapidly after feeding both *Karlodinium* species of different densities. The changes were the most significant in mantle where the glycogen contents were the highest. The increase of glycogen content was related to the algal species and density. In low algal density group, the glycogen content in toxic group was significantly lower than that in non-toxic algal groups. This study showed that, toxic *Karlodinium* species may affect the growth and survival of the clam through certain non-acute processes, such as by impacting the normal grazing process and interfering the biochemical metabolisms.

Key words: *Karlodinium veneficum*; *Karlodinium zhouanum*; *Ruditapes philippinarum*; grazing; glycogen content

(责任编辑 章践立)