#### DOI: 10.5846/stxb202105191311

宋伦,宋广军,吴金浩,杨国军,刘印,刘苏萱.长山群岛海域真核微藻粒级结构及扇贝摄食选择性.生态学报,2022,42(16):6838-6852. Song L, Song G J, Wu J H, Yang G J, Liu Y, Liu S X.Particle size structure of eukaryotic microalgae and feeding selectivity of scallops in the waters of Changshan Islands.Acta Ecologica Sinica,2022,42(16):6838-6852.

# 长山群岛海域真核微藻粒级结构及扇贝摄食选择性

宋 伦<sup>1,\*</sup>,宋广军<sup>1</sup>,吴金浩<sup>1</sup>,杨国军<sup>2</sup>,刘 印<sup>2</sup>,刘苏萱<sup>2</sup>

1 辽宁省海洋水产科学研究院,海洋生物资源与生态学重点实验室,大连 116023 2 大连海洋大学,大连 116023

摘要:采用高通量测序-分子鉴定分级技术于 2019 年对长山群岛全海域真核微藻粒级结构进行了研究。结果发现,春季以中(47%)、小粒级(41%)为主,夏季以小(39%)、大粒级(38%)为主,秋季以大粒级(60%)为主,春、夏、秋季小、中、大粒级微藻比例为 42:47:11、39:23:38、22:18:60。小粒级微藻优势种为细小微胞藻(Micromonas pusilla)、融合微胞藻(Micromonas commoda)和 金牛微球藻(Ostreococcus tauri),中粒级微藻优势种为剧毒卡尔藻(Karlodinium veneficum)、大粒级微藻优势种为柔弱几内亚藻 (Guinardia delicatula)、平野亚历山大藻(Alexandrium hiranoi)、多纹膝沟藻(Gonyaulax polygramma),综合整个真核微藻群落,春季由中粒径的剧毒卡尔藻占据优势(23.9%),夏季由大粒径的平野亚历山大藻占据优势(29.4%),秋季由大粒径的多纹膝沟藻 占据优势(66.8%),有毒甲藻在该海域中占有绝对优势,贝毒累积风险较高,小粒径微藻中金牛微球藻和抑食金球藻曾在渤海 引发褐潮,潜在威胁该海域贝类养殖业。虾夷扇贝对小粒级和大粒级微藻的选择性较低,对中粒级微藻的选择性较高,尤其对 水体中优势种剧毒卡尔藻—直表现出主动选择。光学需氧量、无机氮、溶解氧、石油类及部分重金属 Cd、As、Hg 影响着整个长 山群岛海域真核微藻粒级结构时空演变。

关键词:真核微藻;粒级结构;环境因素;摄食选择;长山群岛海域

## Particle size structure of eukaryotic microalgae and feeding selectivity of scallops in the waters of Changshan Islands

SONG Lun<sup>1,\*</sup>, SONG Guangjun<sup>1</sup>, WU Jinhao<sup>1</sup>, YANG Guojun<sup>2</sup>, LIU Yin<sup>2</sup>, LIU Suxuan<sup>2</sup> 1 Key Laboratory of Marine Biological Resources and Ecology, Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China 2 Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

**Abstract**: The Chang-shan Archipelago is the largest island group in the northern waters of the Yellow Sea. It significantly contributes to local economic development due to its abundant aquatic products. In recent years, economically important shellfish (scallops, oysters, and clams) have exhibited growth retardation, thinning, and increased mortality, which has affected the sustainable and healthy development of fisheries. Marine microalgae are the dominant food source for filter-feeding shellfish; they differ in size, physiological functions, and sedimentation rates, which greatly influence the regional ecosystem food web. The microalgae size-fractions are closely related to the nutrient reserves and healthy growth of filter-feeding shellfish. High-throughput sequencing technology can reveal highly diverse eukaryotic lineages, while significantly reducing the errors associated with species identification, particularly microalgae. Importantly, the microalgae composition can be ascertained at multiple taxonomic levels, including at the species level. However, some questions still remain regarding their quantitative estimates. As the number of rDNA copies varies widely among different eukaryotes, it is difficult to determine the abundance of eukaryotic microalgae from rDNA CN-based inferences in environmental samples. However,

收稿日期:2021-05-19; 网络出版日期:2022-04-20

\* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: songlun2019@ qq.com

基金项目:辽宁省'兴辽英才计划'项目(XLYC1907109);大连市杰出青年科技人才项目(2019RJ09);现代农业体系建设专项(CARS-49)

related studies have demonstrated a significant positive correlation between rDNA sequence polymorphisms and rDNA copy numbersrate. When the size of the cell varies in a population, the rRNA/rDNA quantity reflects the biomass of that population. In this study, the proportion of rDNA copy numbers of eukaryotic microalgae was used to characterize their size distribution (the proportion of pico-, nano-, and microphytoplankton). In aquatic ecosystems, the factors controlling phytoplankton production and their seasonal successions are the main items of phytoplankton ecology. Several factors are linked to the growth and size-fraction structure of phytoplankton, such as the availability of light, temperature, nutrients, competition, and parasitism. Therefore, phytoplankton structure can be considered an integrator of environmental factors. In this study, we used the high-throughput sequencing method to assess the size-fraction structure of phytoplankton as well as the controlling environmental factors around the Changshan Islands. It showed that the proportion of pico-, nano-, and microphytoplankton was 42:47:39 in spring, 39:23:38 in summer, and 22:18:60 in autumn. Micromonas pusilla, Micromonas commoda, and Ostreococcus tauri were the dominant picophytoplankton; Karlodinium veneficum was the dominant nanophytoplankton; and Guinardia delicatula, Alexandrium hiranoi, and Gonyaulax polygramma were the dominant microphytoplankton around the Changshan Archipelago. Moreover, Karlodinium veneficum, Alexandrium hiranoi, and Gonyaulax polygramma were the dominant species in spring, summer, and autumn, respectively. The Mizuhopecten yessoensis selectivity to small and large microalgae was low, while the selectivity to medium microalgae was high, especially to Karlodinium veneficum, the dominant species in water. Environmental factors such as COD(chemical oxygen demand), DIN(dissolved inorganic nitrogen), DO(dissolved oxygen), Oil, Cd, As, and Hg were significantly related to the growth and size-fraction structure of phytoplankton. In the three seasons, Cd and COD were significantly related to the growth of picophytoplankton biomass; DO, DIN, and Oil were significantly related to the growth of picophytoplankton biomass; and COD, As, and Hg were significantly related to the growth of picophytoplankton biomass.

Key Words: eukaryotic microalgae; size fraction; environmental factors; feeding selectivity; Changshan Islands

大连长山群岛是海水贝类的主要增养殖区,近40年来为地方经济发展做出了巨大贡献。但近10年,增 养殖双壳贝类死亡率普遍升高,严重制约了贝类增养殖业的可持续健康发展。饵料微藻作为滤食性贝类的营 养基础,不同粒级营养含量差异较大,被滤食性贝类利用率也不同<sup>[1-2]</sup>。

小粒级微藻会影响贝类营养储备和健康生长,尤其对质量选择型的贝类影响更大<sup>[3]</sup>。因此研究小粒级 微藻群落结构演变尤为重要,但目前微藻的分类鉴定依然依靠传统的形态学镜检,对小粒级微藻的检出率较 低。高通量测序鉴定技术可加速小粒径微藻多样性的高效检测<sup>[4-7]</sup>。目前,分析海水中微藻粒级的方法用的 最多的是叶绿素 a 分级法,将被测海水依次通过不同孔径的滤膜过滤,检测其叶绿素 a 含量表征微藻粒级生 物量,但该方法会严重低估中、小粒级微藻的生物量,而高估>20 µm 大粒径微藻生物量的贡献,研究发现,该 方法对小粒径微藻生物量的测算误差最高超过 80%<sup>[8-10]</sup>。分子鉴定法相比传统形态学鉴定更加精准、高效、 符合实际,应用前景广阔。研究发现,环境样本中真核生物 rDNA 序列多态性与细胞中 rDNA 的拷贝数成正 比<sup>[11-12]</sup>,即真核微藻细胞体积(生物量)与 rDNA 的拷贝数成正比<sup>[13-15]</sup>,因此,不同真核微藻分子鉴定获取的 rDNA 序列数之比即为生物量占比,可用于微藻全粒级结构深度分析。宋等<sup>[16]</sup>采用该方法解析了长海县大长 山岛邻近海域微藻粒级组成与环境因子的关联。

本研究在采集微藻样品的基础上,对长山群岛海域微藻粒级结构在时空上的演变,其与虾夷扇贝摄食选择性等进行分析,探讨环境因子对各粒级微藻结构的影响关联,采用高通量测序-分子鉴定分级技术对该海域 微藻粒级结构进行估算,研究海洋微藻粒级时空分布与环境关联及对扇贝摄食选择的影响,为精准研究滤食 性贝类供饵力提供参考。

## 1 材料与方法

#### 1.1 样品采集及制备

2019 年在长山群岛海域垂岸布设9个站位(图1),分别于 2019 年 5 月(春)、8 月(夏)、10 月(秋)采集真 核微藻分子鉴定样品。每个站位采集表层海水1L,现场用0.22 μm 微孔滤膜收集全部微藻,然后将滤膜转移 至 1.5 mL 无菌离心管中,置于-80℃冷冻保存、运输。同期进行海水的水深(Dep)、pH、盐度(Sal)、溶解氧 (DO)、悬浮物(SS)、叶绿素 a(Chla)、化学需氧量(COD)、石油类(Oil)、无机氮(DIN)[铵盐(NH<sup>4</sup><sub>4</sub>)、硝酸盐 (NO<sup>5</sup><sub>3</sub>)、亚硝酸盐(NO<sup>5</sup><sub>2</sub>)之和]、无机磷(DIP)、总氮(TN)、总磷(TP)、硅酸盐(SiO<sup>2-</sup><sub>3</sub>)、重金属汞(Hg)、铅 (Pb)、铜(Cu)、锌(Zn)、镉(Cd)、铬(Cr)、砷(As)等指标的监测。调查、检测、质量控制方法均参照《海洋调 查规范》(GB/T 12763—2007)<sup>[17]</sup>和《海洋监测规范》(GB17378-2007)<sup>[18]</sup>执行。现场在5号站位分别于5、 6、7月采集10只活力较好的筏养首层虾夷扇贝,取出胃含物置于-80℃冷冻保存、运输,用于微藻分子鉴定; 同期采集表层海水1L,现场用0.22 μm 微孔滤膜收集全部微藻,然后将滤膜转移至1.5 mL 无菌离心管中,置 于-80℃冷冻保存、运输,用于微藻分子鉴定,进行贝类摄食选择性分析。



#### 1.2 微藻基因组 DNA 提取

采用 CTAB 法提取真核微藻宏基因组,具体参考相关文献<sup>[16]</sup>。

1.3 18S rDNA V4 可变区的 PCR 扩增 利用自行开发的真核微藻 18S rDNA 的 V4 区基因扩增引物进行 PCR 扩增,具体步骤参考相关文献<sup>[19]</sup>。

## 1.4 测序数据质量控制

测序所得原始数据处理、有效数据质量过滤、物种聚类、微藻注释等质量控制方法参考相关文献<sup>[20]</sup>。

1.5 数据分析

物种聚类、注释分类采用的方法和数据库参考相关文献[21]。根据相关研究,不同粒径的真核微藻序列数

比例更接近于生物量比例<sup>[13-16]</sup>,将各个样本微藻优势度超过 0.1%的种类作为整体优势种参与粒级结构统 计,根据相关文献将筛查出的优势种按等效球径进行筛检分级<sup>[13-15,22-25]</sup>,根据各粒径微藻序列占比统计其粒 级结构,同时利用序列数占比和总叶绿素 a 浓度可测算各粒级微藻的叶绿素 a 浓度,相关公式:

$$D_{Bi} = \frac{D_C}{N_C} N_{Bi}$$

式中, $D_{Bi}$ 为某粒级微藻的叶绿素 a 浓度( $\mu g/L$ ); $N_{Bi}$ 为总叶绿素 a 浓度( $\mu g/L$ ); $D_c$ 为某粒级微藻的序列数; $N_c$  为所有微藻的序列数。

物种生物量优势度(Y)表示微藻群落中某一物种质量所占的优势程度:

$$Y = \frac{n_x}{N} f_x$$

式中, $n_x$ 为第 x 种微藻种类的 OTUs (Operational Taxonomic Units)数,N 为 OTUs 总数, $f_x$ 为第 x 种微藻种类在 各样品中出现的频率。

采用 Ivlev 选择指数 E 来分析贝类对微藻的摄食选择性<sup>[26]</sup>:

$$E = \frac{r_i - p_i}{r_i + p_i}$$

式中,*r<sub>i</sub>*表示微藻*i* 在贝类胃含物中所占的百分比,*p<sub>i</sub>*表示微藻*i* 在水体中的生物量百分比。*E* 范围为[-1, 1],当*E* 为-1时,表示贝类避食微藻*i*;当*E* 为1时,表示贝类主动选择微藻*i*;当*E* 接近 0时,表示贝类随机 摄食浮游植物*i*。

本文的小、中、大粒径微藻表述分别代指微微型藻类(0.22—3 µm)、微型藻类(3—20 µm)及小型藻类(>20 µm)。

对上述公式计算、数据分析、RDA 排序图均通过 WPS Office、SPSS 19.0、PRIMER 5.0 软件完成。

#### 2 结果与分析

## 2.1 测序数据质量和物种注释

测序所得有效数据春季每个样品平均获得 89616 条原始序列,夏季获得 91419 条原始序列,秋季获得 83722 条原始序列,经过拼接和质量过滤,春夏秋季每个样品平均得到 78709、81392、76988 条有效序列,高质 量序列数均达到 87%以上,测序正确率达到 98%以上,测序数据准确可靠,可进行 OTUs 聚类和物种分类分析。数据处理过程中各步骤得到的统计结果见表 1。

			Table 1 T	The statistics of	effective tags a	and OTUs nu	mbers			
季节 Seasons	原始序列数 Original Tags	拼接序列数 Raw Tags	过滤低质量 和短长度 后序列数 Clean Tags(#)	有效序列数 Effective Tags	有效碱基数 Base(nt)	有效序列 平均长度 Avglen/nt	Q20/%	Q30/%	有效序列数 中 GC 碱基的 含量 GC/%	有效序列数 占比 Effective/%
春 Spring	89616	84256	82867	78709	29517683	375	98	94	44.12	87.80
夏 Summer	91419	85537	84179	81392	30408251	374	98	93	43.21	89.00
秋 Autumn	83722	79636	78711	76988	28823487	374	98	93	42.79	92.00

表1 有效序列数及 OTUs 数统计

OTUs:分类操作单元 Operational taxonomic units;Q20:表示序列中碱基质量值大于 20(测序错误率小于 1%)的碱基占比 Indicates the proportion of bases with a base quality value greater than 20 (sequencing error rate less than 1%) in the sequence;Q30:表示序列中碱基质量值大于 30(测序错误率小于 0.1%)的碱基占比 Indicates the proportion of bases with a base quality value greater than 30 (sequencing error rate less than 0.1%) in the sequence;CC:鸟嘌呤和胞嘧啶占比 The ratio of Guanine and CytosineOTUs:可操作分类单元 Operational Taxonomic Units;Q20:测序质量值 Quality,表示序列中碱基质量值大于 20(测序错误率小于 1%)的碱基占比;Q30:测序质量值 Quality,表示序列中碱基质量值大于 20(测序错误率小于 1%)的碱基占比;Q30:测序质量值 Quality,表示序列中碱基质量值大于 30(测序错误率小于 0.1%)的碱基占比;CC:鸟嘌呤和胞嘧啶占比 Guanine and cytosine

## 2.2 真核微藻各粒级优势种演替规律

长山群岛各粒级微藻优势种及优势度分析见表 2 和图 2。其中,春季融合微胞藻(Micromonas commoda)、 曼吉尼刺囊甲藻(Blastodinium mangini)、细小微胞藻(Micromonas pusilla)在小粒级微藻群落中生物量优势度 较高,分别为 0.166、0.119、0.114;夏季细小微胞藻、金牛微球藻(Ostreococcus tauri)、曼吉尼刺囊甲藻生物量优 势度较高,分别为 0.342、0.257、0.057;秋季金牛微球藻、曼吉尼刺囊甲藻、细小微胞藻生物量优势度较高,分别 为 0.263、0.231、0.163。综合来看,细小微胞藻和金牛微球藻在小粒级微藻群落中占有绝对优势,春夏秋季演 替规律由细小微胞藻占优势转为金牛微球藻控制生态位。由于小粒级微藻粒径较小,细胞中 rDNA 的拷贝数 较少,推测其数量优势度在整个微藻群落中占有绝对优势。

Table 2 Three dominant microalgae species in different size-fraction structure								
粒级结构	优势种	春	夏	秋				
Size-fraction	Dominant species	Spring	Summer	Autumn				
小型微藻	柔弱几内亚藻 Guinardia delicatula	0.245	_	_				
Micro-	北极多甲藻 Islandinium minutum	0.193	—	—				
	微型裸甲藻 Gymnodinium microreticulatum	0.151	—	—				
	红色赤潮藻 Akashiwo sanguinea	—	0.092	—				
	平野亚历山大藻 Alexandrium hiranoi	_	0.591	—				
	多纹膝沟藻 Gonyaulax polygramma	—	0.057	0.905				
	斯氏多沟藻 Polykrikos schwartzii	_	—	0.035				
微型微藻	剧毒卡尔藻 Karlodinium veneficum	0.457	0.362	0.678				
Nano-	三叶原甲藻 Prorocentrum triestinum	0.151	0.121	0.084				
	虫黄甲藻 Ansanella granifera	0.048	0.128	—				
	旋链海链藻 Thalassiosira curviseriata	—	—	0.048				
微微型微藻	融合微胞藻 Micromonas commoda	0.166	—	—				
Pico-	细小微胞藻 Micromonas pusilla	0.114	0.342	0.163				
	曼吉尼刺囊甲藻 Blastodinium mangini	0.119	0.057	0.231				
	金牛微球藻 Ostreococcus tauri	—	0.257	0.263				

表 2 3 不同粒级微藻优势种





物种下方数字为该物种在本粒级中优势度

春季剧毒卡尔藻(Karlodinium veneficum)和三叶原甲藻(Prorocentrum triestinum)在中粒级微藻群落中生物量占有绝对优势,优势度分别为 0.457、0.151;夏季剧毒卡尔藻(Karlodinium veneficum),虫黄甲藻(Ansanella granifera),三叶原甲藻生物量优势度较高,分别为 0.362、0.128、0.121;秋季剧毒卡尔藻和三叶原甲藻生物量

优势度较高,分别为0.678、0.084。综合来看,各季节剧毒卡尔藻在中粒级微藻群落中一直占有绝对优势。

春季柔弱几内亚藻(Guinardia delicatula),北极多甲藻(Islandinium minutum),微型裸甲藻(Gymnodinium microreticulatum),矮小短棘藻(Detonula pumila),中肋海链藻(Thalassiosira mala)在大粒级微藻群落中生物量 优势度较高,分别为 0.245、0.193、0.151、0.142、0.131;夏季平野亚历山大藻(Alexandrium hiranoi)和红色赤潮 藻(Akashiwo sanguinea)生物量优势度较高,分别为 0.591、0.092;秋季多纹膝沟藻(Gonyaulax polygramma)生 物量占有绝对优势,优势度为 0.905。大粒级微藻优势种在各季节演替较大,分别由不同种类占据主要生态位。

综合整个真核微藻种群优势分析,春季由中粒径的剧毒卡尔藻占有绝对优势,占比23.9%,其他微藻占比 均小于8%;夏季由大粒径的平野亚历山大藻占有绝对优势,占比29.4%,其他微藻占比均小于10%;秋季由大 粒径的多纹膝沟藻占有绝对优势,占比高达66.8%,其他微藻占比均小于11%。由此可见,虽然整个微藻群落 由大粒级微藻控制生态位,但都是有毒的甲藻,对长山群岛海域增养殖的贝类贝毒累积风险较高。

#### 2.3 微藻粒级结构特征

图 3 给出了春夏秋季不同粒级叶绿素 a 含量,春季长山群岛海域微藻生物量由中小粒级控制,夏季中小粒级生物量减低至与大粒级水平,秋季大粒级生物量猛增,主要是由有毒的多纹膝沟藻贡献所致。

真核微藻粒级结构分析结果显示,春季小粒级微藻组成平均(42±4)%,中粒级微藻组成平均(47±4)%, 大粒级微藻组成平均(11±1)%(图4);夏季小粒级微藻组成平均(39±13)%,中粒级微藻组成平均(23± 11)%,大粒级微藻组成平均(38±21)%,各站位分布差异比较大(图5);秋季小粒级微藻组成平均(22±8)%, 中粒级微藻组成平均(18±6)%,大粒级微藻组成平均(60±8)%,各站位分布差异比较大(图6)。



图 3 春、夏、秋季真核微藻各粒级含量







#### 图 4 春季真核微藻粒级结构







整体而言,长山群岛海域春季真核微藻以中、小粒级为主,整体生物量较高,小、中、大粒级微藻生物量比 例为42:47:11;夏季以小、大粒级为主,各站位粒级结构波动较大,整体生物量较低,小粒级微藻主要分布在近 岸海域,大粒级微藻主要分布在离岸海域,小、中、大粒级微藻比例为39:23:38;秋季以大粒级为主,生物量上 升较大,各站位粒级结构相对比较均衡,小、中、大粒级微藻比例为22:18:60。

## 2.4 扇贝对微藻粒级的摄食选择性

采用 Ivlev 选择指数 E 对小长山岛海域 5—7 月虾夷扇贝胃含物与水体中微藻粒级进行了分析。发现筏 养虾夷扇贝对小粒级和大粒级微藻的选择性较低,对中粒级微藻的选择性较高(图 7—9),尤其对水体中优势 种剧毒卡尔藻一直表现出主动选择,5、6、7 月选择性指数均为正值,分别为 0.23、0.39、0.88(表 3)。图 10 也 显示了虾夷扇贝主要摄食甲藻,主要种类也为剧毒卡尔藻。虾夷扇贝对水体中优势种小粒级的金牛微球藻、 细小微胞藻、抑食金球藻(Aureococcus anophagefferens),中粒级的阿米巴藻属(Amoebophrya sp.)、球形棕囊藻 (Phaeocystis globosa)、雷克斯棕囊藻(Phaeocystis rex),大粒级的旋转海链藻(Thalassiosira curviseriata)、丝状短 棘藻(Detonula confervacea)、多米尼环沟藻(Gyrodinium dominans)、平野亚历山大藻显示出明显回避性,选择 性指数均为负值。



图 7 虾夷扇贝胃含物与水体中微藻粒级生物量占比 Fig.7 The proportion of stomach contents and microalgae particle biomass in water of *Mizuhopecten yessoensis* 



图 9 虾夷扇贝对不同粒级微藻的选择指数





图 8 虾夷扇贝胃含物与水体中小粒级微藻生物量占比 Fig.8 Biomass ratio of stomach contents and small and medium sized microalgae in water of *Mizuhopecten yessoensis* 



Fig.10 Selectivity index of different groups of microalgae in Mizuhopecten yessoensis

## 2.5 真核微藻粒级结构与环境因素关联

春、夏、秋季长山群岛真核微藻粒级结构与环境因子的 RDA 分析见图 11, RDA 分析中微藻种类缩写编码 见表 4, 环境因子的解释量及显著性检验见表 4。其中, 春季显著控制小粒级微藻群落结构的环境因素有重金 属 Cd(*P*<0.01)、水深和 COD(*P*<0.05), 显著控制中粒级微藻群落结构的环境因素只有 DO(*P*<0.05), 显著控制中粒级微藻群落结构的环境因素只有 COD(*P*<0.05)。

夏季显著控制小粒级微藻群落结构的环境因素有重金属 Cd 和 DIN(P<0.05),显著控制中粒级微藻群落结构的环境因素有 DIN、pH、Oil(P<0.05),显著控制大粒级微藻群落结构的环境因素有重金属 As 和盐度 Sal(P<0.05)。

秋季显著控制小粒级微藻群落结构的环境因素有 COD 和 Sal(P<0.01),显著控制中粒级微藻群落结构的 环境因素只有 Oil(P<0.05),显著控制大粒级微藻群落结构的环境因素有重金属 Hg(P<0.01)和DO(P<0.05)。 总体来看,COD、DIN、DO、Oil 及部分重金属 Cd、As、Hg 影响着整个真核微藻粒级结构时空演变。

物种	 粒级	类群	5月 May 6月 June			7月 July					
Species	Size-fraction	Group	G/%	W/%	Е	G/%	W/%	Ε	G/%	W/%	Ε
金牛微球藻 Ostreococcus tauri	小	绿藻	0	0.6	-1.00	0	0.3	-1.00	0	4.2	-1.00
细小微胞藻 Micromonas pusilla	小	绿藻	0	13.2	-1.00	1.4	6.5	-0.64	0	23.6	-1.00
密球藻 Pycnococcus provasolii	小	绿藻	3.1	0.2	0.87	3.2	1.7	0.30	0	1.2	-1.00
具翅冠突藻 Pterosperma cristatum	小	绿藻	2.3	0.1	0.93	1.1	0.7	0.21	0	0	-1.00
海洋真核生物克隆 Eukaryote marine clone ME1-21	小	甲藻	0	3.7	-1.00	1.1	0	0.92	0	0	_
海洋真核生物克隆 Eukaryote marine clone ME1-22	小	甲藻	0.1	0.5	-0.67	12.6	2.4	0.68	1.0	1.0	-0.03
海洋真核生物克隆 Eukaryote marine clone MfE1-24	小	甲藻	0.1	0.4	-0.58	0.4	8.4	-0.92	0	4.6	-1.00
海洋真核生物克隆 Eukaryote marine clone ME1-20	小	甲藻	0	1.9	-1.00	0	2.6	-1.00	0	2.4	-1.00
抑食金球藻 Aureococcus anophagefferens	小	金藻	0	0.3	-1.00	0	2.1	-1.00	0	0.1	-1.00
剧毒卡罗藻 Karlodinium veneficum	中	甲藻	90.9	56.3	0.23	26.4	11.5	0.39	95.1	6.0	0.88
阿米巴藻属 Amoebophrya sp1.	中	甲藻	0	3.0	-1.00	0	11.7	-1.00	0	0.5	-1.00
虫黄甲藻 Ansanella granifera	中	甲藻	0.8	0	0.89	25.3	0.1	0.99	0	0	-1.00
三角异帽藻 Heterocapsa triquetra	中	甲藻	0	0.1	-0.75	10.8	0.1	0.98	0	0	-1.00
阿米巴藻 Amoebophrya sp2.	中	甲藻	0	0	_	0	8.8	-1.00	0	0.1	-1.00
球形棕囊藻 Phaeocystis globosa	中	定鞭藻	0	1.1	-1.00	0	1.3	-1.00	0	7.1	-1.00
雷克斯棕囊藻 Phaeocystis rex	中	定鞭藻	0	9.6	-1.00	0	0.2	-1.00	0	0.1	-1.00
旋转海链藻 Thalassiosira curviseriata	大	硅藻	0	0.4	-0.96	0.4	3.8	-0.82	0	0.7	-1.00
斜生四链藻 Tetradesmus obliquus	大	硅藻	0	0	1.00	1.4	0	1.00	3.9	0	1.00
斜生四链藻 Detonula confervacea	大	硅藻	0	2.8	-1.00	0	5.6	-1.00	0	1.7%	-1.00
伪根管藻 Rhizosolenia fallax	大	硅藻	0	0	1.00	3.6	0	1.00	0	0	—
多米尼环沟藻 Gyrodinium dominans	大	甲藻	0	0.3	-1.00	0	6.3	-1.00	0	0.2	-1.00
平野亚历山大藻 Alexandrium hiranoi	大	甲藻	0	0.2	-1.00	0	0.1	-1.00	0	36.7	-1.00
科夫多沟藻 Polykrikos kofoidii	大	甲藻	0.2	0	1.00	4.3	0	1.00	0	0	_
红色赤潮藻 Akashiwo sanguinea	大	甲藻	0	0	1.00	2.2	0	1.00	0	0	—

表 3 虾夷扇贝对微藻的选择指数 Table 3 Selectivity index of microalgae in *Mizuhopecten yessoensis* 

G:胃含物中微藻占比;W:水体中微藻占比;E:选择指数;"一":该月扇贝胃含物和水体中均无该藻

## 表 4 环境因子的解释量及显著性检验

#### Table 4 The interpretation quantity and significance test of environmental factors

季节 Seasons	粒级 Size-fraction	环境因子 Environmental factors	环境因子解释量 Interpretation quantity	pseudo-F	Р
春	小	水深	26.7	3.6	0.014
		镉	18.7	3.1	0.010
		化学需氧量	11.2	2.1	0.046
	中	溶解氧	34.3	5.2	0.046
	大	化学需氧量	15.6	3.5	0.030
夏	小	镉	28	3.9	0.014
	中	无机氮	35.9	5.6	0.022
		石油烃	10	6.9	0.032
	大	砷	18.9	4.6	0.042
秋	小	盐度	73.4	27.5	0.010
		化学需氧量	13	8.6	0.010
	中	石油烃	38.8	6.3	0.024
	大	汞	50	10	0.006
		溶解氧	1.4	11.6	0.028



#### 图 11 春季小粒级微藻群落结构与环境因子 RDA 排序



RDA:冗余分析;COD:化学需氧量;DIP:无机磷;DIN:无机氮;DO:溶解氧;Dep:水深;Oil:石油类;Cd:镉;Kar mic 微小卡罗藻 Karlodinium micrum;Coc pol:阿米巴藻属有害甲藻 Cochlodinium polykrikoides;Hal sp:海球藻属 Halosphaera sp.;Bat pra:绿色葡萄藻 Bathycoccus prasinos; Euk clone:真核微藻;Euk clo2:真核微藻;Mic Com:融合微胞藻 Micromonas commoda;Mic pus:细小微胞藻 Micromonas pusilla;Pte cri:具翅冠突 藻 Pterosperma cristatum;Cer fal:共甲藻 Ceratoperidinium falcatum;Ost tau:金牛微球藻 Ostreococcus tauri;Pyc pro:密球藻 Pycnococcus provasolii; Bla man:曼吉尼刺囊甲藻 Blastodinium mangini;Aur ano:抑食金球藻 Aureococcus anophagefferens;Pra sp:青绿藻属 Prasinophyceae sp.;Pro mic: 海洋原甲藻 Prorocentrum micans;Pro min:微小原甲藻 Prorocentrum minimum;Eud cre:波缘杜波斯克藻 Euduboscquella crenulata;Ima rot:棕囊 藻属 Imantonia rotunda;Mam gil:青绿藻 Mamiella gilva;Bla con:扭曲刺囊甲藻 Blastodinium contortum;Amo sp:阿米巴藻属 Amoebophrya sp.; Mar sp:共球藻属 Marsupiomonas sp.;Fav arc:杜波斯克属 Favella arcuata

## 3 讨论

## 3.1 真核微藻优势种及粒级结构演变

本研究发现,长山群岛海域第一优势种均为有毒甲藻,春季为剧毒卡尔藻占比 23.9%,夏季为平野亚历山 大藻占比 29.4%,秋季为多纹膝沟藻占比 66.8%,均高于黄海北部优势种平均值(3 种优势种分别占比 21.3%、 23.6%、56.6%)<sup>[7]</sup>,说明该海域为有毒甲藻主要分布区,应引起注意。从粒级结构看,长山群岛海域小粒级真 核微藻占比(春季 42%、夏季 39%、秋季 22%)与黄海北部整体水平(39%、夏季 40%、秋季 26%)相差不大,春 夏季略微偏高,不利于滤食性的贝类营养储备<sup>[7]</sup>。本次调查的小粒级真核微藻优势种主要为细小微胞藻和 金牛微球藻,而 2018 年大长山岛临近海域调查的优势种为抑食金球藻<sup>[16]</sup>,虽然优势种年度间发生演替,但金 牛微球藻和抑食金球藻作为褐潮致灾种,应引起关注<sup>[10,19,27]</sup>,当然,微藻粒级结构的测算方法需不断完善和 优化,使研究结果更趋于客观实际<sup>[3,9,16]</sup>。

## 3.2 不同微藻粒级对扇贝摄食的影响

本研究发现筏养虾夷扇贝对小粒级和大粒级微藻的选择性都较低,对中粒级微藻的选择性确较高,尤其 对水体中优势种甲藻剧毒卡尔藻一直表现出主动选择。有研究表明,滤食性贝类对甲藻的摄食选择性要高于 其他类群<sup>[26]</sup>。本研究发现,同样作为水体中的优势种,小粒级的金牛微球藻、细小微胞藻、抑食金球藻,虾夷 扇贝却选择避食,表明扇贝摄食选择的复杂性。Cranford 等<sup>[28]</sup>发现滤食性贝类偏好摄食微型藻类,Strohmeier 等<sup>[29]</sup>发现紫贻贝(*Mytilus edulis*)对藻类的截留率从小粒径到大粒径逐渐增大,最大的截留率在 7—35 µm。 Rosa 等<sup>[30]</sup>研究发现贻贝对 4 µm 及以上的藻类有较高的截留率,Dunphy<sup>[31]</sup>也发现牡蛎 6 µm 微藻的截留效



图 12 春季中粒级微藻群落结构与环境因子 RDA 排序



Sal:盐度; SS: 悬浮物; Pro tri: 三叶原甲藻 Prorocentrum triestinum; Cha sp: 角毛藻属 Chaetoceros sp.; Tha con: 凹海链藻 Thalassiosira concaviuscula; Tha nor: 诺登海链藻 Thalassiosira nordenskioeldii; Gui str: 斯氏几内亚藻 Guinardia striata; Ske sub: 敏盐骨条藻 Skeletonema subsalsum; Ast gla:冰河拟星杆藻 Asterionellopsis glacialis; Ske men:曼氏骨条藻 Skeletonema menzellii; Cha mue: 牟氏角毛藻 Chaetoceros muellerii; Tha nod: 结线形海链藻 Thalassiosira nodulolineata; Pyr sp:青绿皮藻属 Pyramimonas sp.; Chr lea: 里氏金色藻 Chrysochromulina leadbeateri; Ans gra: 虫黄甲藻 Ansanella granifera; Kar ven: 剧毒卡尔藻 Karlodinium veneficum; Nep pyr: 双鞭绿藻 Nephroselmis pyriformis; Spu sp: 色金藻属 Spumella sp.; Tha pro: 深海链藻 Thalassiosira profunda; Chl kuw: 库瓦达衣藻 Chlamydomonas kuwadae; Ske tro: 热带骨条藻 Skeletonema tropicum; Hem cry: 球半隐藻 Hemiselmis cryptochromatica

率低于 15 µm 粒径的微藻。张继红<sup>[32]</sup>发现紫贻贝对于 2 µm 的微藻截留率为 19%、长牡蛎为 17%、栉孔扇贝 仅为 8%,对 2 µm 以下的颗粒物截留效率更低。上述研究结论与本研究发现的现象一致。该海域作为虾夷 扇贝主产区,不但微藻粒级结构影响其摄食营养与存活<sup>[33]</sup>,有毒藻类更影响其质量安全,因此应推进微藻分 子鉴定法应用,并加强贝毒潜在风险监测<sup>[34]</sup>。

## 3.3 环境因子对微藻粒级结构的影响

水体中环境因子对微藻生长、繁殖影响较大,进而控制其种群及群落在时空上的演变。本研究发现,不同 季节控制各粒级微藻群落结构空间分布的环境因素不尽相同,总体而言,COD(春秋季)对小粒级微藻群落结 构影响较大,说明某些小粒级微藻可对有机物进行高效利用<sup>[10]</sup>,一般真核微藻都偏好无机营养盐,如无机氮、 磷、硅都是微藻生长的必须元素<sup>[35—37]</sup>。同时发现春夏季重金属 Cd 都显著控制小粒级微藻群落结构在空间 上的分布,且对小粒级真核微藻优势种细小微胞藻和金牛微球藻均是正向影响,应加强河流陆源入海重金属 的消减防控。当然,微藻粒级结构演变除受环境因子的上行效应影响之外,贝类及浮游动物大量摄食的下行 效应也会影响微藻的粒级结构<sup>[38—39]</sup>。该海域几十年来主要增养殖扇贝、牡蛎等滤食性贝类,对天然饵料微藻 需求量较大。随着陆源氮磷的消减,海域无机营养盐逐渐减少,可能会加剧微藻小型化趋势,希望能得到有关 方面的关注。

## 4 结论

(1)长山群岛海域真核微藻春季以中(47%)、小粒级(41%)为主,主要优势种为剧毒卡尔藻(23.9%);夏





#### Fig.13 Community structure of macroalgae and RDA ranking of environmental factors in spring

Gym mic:微型裸甲藻 Gymnodinium microreticulatum; Lev fis:菲斯环沟藻 Levanderina fissa; Per qui:五刺多甲藻 Peridinium quinquecorne endosymbiont; Oxy oxy:高氧鰭藻 Oxyphysis oxytoxoides; Tha mal:中肋海链藻 Thalassiosira mala; Ale aff:相关亚历山大藻 Alexandrium affine; Pse mul:多列拟菱形 藻 Pseudo-nitzschia multiseries; Gra ton:通洋多甲藻 Grammatodinium tongyeonginum; Cer pel:大洋角管藻 Cerataulina pelagica; Gui del:柔弱几内亚藻 Guinardia delicatula; Tha rot:圆海链藻 Thalassiosira rotula; Gon spi:具刺膝沟藻 Gonyaulax spinifera; Det pum:矮小短棘藻 Detonula pumila; Par imp: 无孔近囊胞藻 Paraphysomonas imperforata



图 14 夏季小粒级微藻群落结构与环境因子 RDA 排序

Fig.14 Community structure of microalgae in summer and RDA ranking of environmental factors

季以小(39%)、大粒级(38%)为主,主要优势种为平野亚历山大藻(29.4%);秋季以大粒级(60%)为主,主要优势种为多纹膝沟藻(66.8%)。



图 15 夏季中粒级微藻群落结构与环境因子 RDA 排序

Fig.15 Community structure of medium size microalgae and RDA ranking of environmental factors in summer







Ale lee:李氏亚历山大藻 Alexandrium leei; War sp: 单眼藻属 Warnowia sp.; Pol sch: 斯氏多沟藻 Polykrikos schwartzii; Aka san: 红色赤潮藻 Akashiwo sanguinea; Ale hir: 平野亚历山大藻 Alexandrium hiranoi; Pol kof: 科夫多沟藻 Polykrikos kofoidii; Isl min: 北极多甲藻 Islandinium minutum; Tha hen: 亨氏海链藻 Thalassiosira hendeyi; Cos sp: 圆筛藻属 Coscinodiscus sp; Con pol: 多纹膝沟藻 Gonyaulax Polygramma; Pyr ste: 斯氏 扁甲藻 Pyrophacus steinii

6849



图 17 秋季小粒级微藻群落结构与环境因子 RDA 排序

Fig.17 Community structure of microalgae and RDA ranking of environmental factors in autumn



图 18 秋季中粒级微藻群落结构与环境因子 RDA 排序 Fig.18 Community structure of medium grain microalgae and RDA ranking of environmental factors in autumn

(2)小粒径微藻中金牛微球藻和抑食金球藻曾在渤海引发褐潮,潜在威胁贝类养殖业。另外有毒甲藻在该海域中占有绝对优势,中粒径的剧毒卡尔藻在春季优势明显,优势度在 0.2 以上,贝毒累积风险较高。

(3)虾夷扇贝对小粒级和大粒级微藻的选择性较低,对中粒级微藻的选择性较高,尤其对水体中优势种 剧毒卡尔藻一直表现出主动选择。



图 19 秋季大粒级微藻群落结构与环境因子 RDA 排序



(4)COD、DIN、DO、Oil及部分重金属Cd、As、Hg影响着整个长山群岛海域真核微藻粒级结构时空演变。

#### 参考文献(References):

- [1] 宋伦, 宋广军, 王年斌, 赵海勃, 田金, 杨爽, 杜静. 辽东湾网采浮游植物粒级结构的胁迫响应. 中国环境科学, 2015, 35(9): 2764-2771.
- [2] 董波,薛钦昭,李军.滤食性贝类摄食生理的研究进展.海洋科学,2000,24(7):31-34.
- [3] 吴文广,张继红,刘毅,王巍,蔺凡. 獐子岛及邻近海域秋季浮游植物的粒级结构及其影响因素. 生态学报, 2018, 38(4): 1418-1426.
- [4] 乔玲, 甄毓, 米铁柱. 抑食金球藻(Aureococcus anophagefferens) 褐潮研究概述. 海洋环境科学, 2016, 35(3): 473-480.
- [5] 刘卫东, 宋伦, 吴景. 环境样本中微型和微微型浮游植物高通量测序的引物优化. 生态学报, 2017, 37(12): 4208-4216.
- [6] Kong F Z, Yu R C, Zhang Q C, Yan T, Zhou M J. Pigment characterization for the 2011 bloom in Qinhuangdao implicated "brown tide" events in China. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2012, 30(3): 361-370.
- [7] 宋伦,毕相东,付杰,宋广军,吴金浩,刘印,刘苏萱.黄海北部真核微藻粒级结构及环境关联.中国环境科学,2021,41(3): 1336-1344.
- [8] 孙军, 刘东艳, 钟华, 张利永. 浮游植物粒级研究方法的比较. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(6): 917-924.
- [9] Song L, Wu J, Du J, Li N, Wang K, Wang P. Comparison of two methods to assess the size structure of phytoplankton community assemblages, in Liaodong Bay, China. Journal of Ocean University of China, 2019, 18(5): 1207-1215.
- [10] 宋伦,吴景,李楠,杜静,杨爽,王鹏.辽东湾潜在褐潮生物时空分布及环境关联.中国环境科学,2018,38(8):3060-3071.
- [11] 郭立亮. 海洋微藻 DNA 条形码基因的评估及环境样本多样性分析和定量基因的开发[D]. 青岛:中国海洋大学, 2015.
- [12] Gong J, Dong J, Liu X H, Massana R. Extremely high copy numbers and polymorphisms of the rDNA operon estimated from single cell analysis of Oligotrich and Peritrich ciliates. Protist, 2013, 164(3): 369-379.
- [13] Zhu F, Massana R, Not F, Marie D, Vaulot D. Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 52(1): 79-92.
- [14] Prokopowich C D, Gregory T R, Crease T J. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. Genome, 2003, 46(1): 48-50.
- [15] Godhe A, Asplund M E, Harnstrom K, Saravanan V, Tyagi A, Karunasagar I. Quantification of diatom and Dinoflagellate biomasses in coastal marine seawater samples by real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(23): 7174-7182.
- [16] 宋伦,毕相东,宋广军,杜静,吴金浩,王志松,胡超魁.海洋真核微藻粒级结构及其环境影响因素.中国环境科学,2020,40(6): 2627-2634.

- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 12763—2007 海洋调查规范. 北京:中国标准出版 社, 2008.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB 17378—2007 海洋监测规范. 北京:中国标准出版 社, 2008.
- [19] 宋伦,吴景,刘卫东,宋永刚,王年斌. 渤海长兴岛海域微型和微微型浮游植物多样性.环境科学研究, 2016, 29(11): 1635-1642.
- [20] Song L, Wu J, Du J, Li N, Song G J, Wang K, Sun M, Wang P. The characteristics and distribution of eukaryotic phytoplankton community in Liaodong Bay, China. Ocean Science Journal, 2019, 54(2): 183-203.
- [21] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner F O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [22] 刘瑞玉. 中国海洋生物名录. 北京: 科学出版社, 2008: 301-870.
- [23] Xu X, Yu Z M, Cheng F J, He L Y, Cao X H, Song X X. Molecular diversity and ecological characteristics of the eukaryotic phytoplankton community in the coastal waters of the Bohai Sea, China. Harmful Algae, 2017, 61: 13-22.
- [24] 于杰. 浮游生物多样性高效检测技术的建立及其在渤海褐潮研究中的应用[D]. 青岛:中国海洋大学, 2014.
- [25] 江雪娇. 北黄海微微型浮游植物的丰度及微微型真核浮游生物分子多样性研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2009.
- [26] 潘绘竹. 黄渤海海域几种典型双壳贝类对浮游植物的摄食规律研究[D]. 广州: 暨南大学, 2020.
- [27] 宋伦, 吴景, 宋永刚, 刘卫东, 杨国军. 褐潮致灾种抑食金球藻在辽东湾的分布. 环境科学研究, 2017, 30(4): 537-544.
- [28] Cranford P J, Li W, Strand Ø, Strohmeier T. Phytoplankton depletion by mussel aquaculture: high resolution mapping, ecosystem modeling and potential indicators of ecological carrying capacity. ICES, 2008.
- [29] Strohmeier T, Strand Ø, Alunno-Bruscia M, Duinker A, Cranford P J. Variability in particle retention efficiency by the mussel *Mytilus edulis*. J Exp Mar Biol Ecol.2012, 412(31): 96-102.
- [30] Rosa M, Ward J E, Ouvrard M, Holohan B A, Espinosa E P, Shumway S E, Allam B. Examining the physiological plasticity of particle capture by the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.): confounding factors and potential artifacts with studies utilizing natural seston. J Exp Mar Biol Ecol.2015, 473: 207-217.
- [31] Dunphy B J, Hall J A, Jeffs A G, Wells R M G. Selective particle feeding by the *Chilean oyster*, *Ostrea chilensis*; implications for nursery culture and broodstock conditioning. Aquaculture. 2006, 261; 594-602.
- [32] 张继红. 滤食性贝类养殖活动对海域生态系统的影响及生态容量评估[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2008.
- [33] 张继红,吴文广,刘毅,蔺凡,王巍,牛亚丽.虾夷扇贝动态能量收支生长模型.中国水产科学,2017,24(3):497-506.
- [34] 宋伦, 吴景, 李楠, 杜静, 王昆, 刘桂英, 王鹏. 辽东湾毒害微藻潜在风险分布及环境关联. 中国环境科学, 2018, 38(8): 3049-3059.
- [35] Luck M, Escobar F V, Glass K, Sabotke M I, Hagedorn R, Corellou F, Siebert F, Hildebrandt P, Hegemann P. Photoreactions of the histidine kinase rhodopsin Ot-HKR from the marine picoalga Ostreococcus tauri. Biochemistry, 2019, 58(14): 1878-1891.
- [36] Echeveste P, Agustí S, Dachs J. Cell size dependent toxicity thresholds of polycyclic aromatic hydrocarbons to natural and cultured phytoplankton populations. Environmental Pollution, 2010, 158(1): 299-307.
- [37] Sunda W G, Huntsman S A. Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: implications for oceanic Cd cycling. Limnology and Oceanography, 2000, 45(7): 1501-1516.
- [38] 蒋昊, 赵亮, 张晶. 黄海溶解无机氮及颗粒有机氮收支与转化模型. 中国环境科学, 2020, 40(9): 3981-3991.
- [39] 张雪, 宋伦, 付杰, 王昆, 刘印, 刘苏萱. 黄海北部滤食性贝类供饵力区划研究. 水产科学, 2021, 40(3): 416-421.