

研究简报

DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2008.60947

## 一种颗石藻水华种的特征界定

周成旭 严小军 孙雪 徐继林 傅永静

(宁波大学海洋生物工程重点实验室, 宁波 315211)

### THE EXPERIMENTAL OBSERVATIONS AND CHARACTERISTICS OF ONE STRAIN OF COCCOLITHOPHORID FROM THE BLOOM WATER IN A SHRIMP POOL, ZHEJIANG, CHINA

ZHOU Cheng-Xu YAN Xiao-Jun SUN Xue XU Ji-Lin and FU Yong-Jing

(Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211)

关键词: 颗石藻; 显微观察; 分子鉴定; 脂类物质; 毒性

**Key words** Coccolithophorid Microscopic observation Molecular analysis Lipid Toxicity

中图分类号: Q178.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)06-0947-05

颗石藻是一类海生或咸水生光自养单细胞鞭毛藻, 可通过光合作用利用  $\text{CO}_2$  合成有机物, 又可通过生物矿化作用在细胞表面形成典型的以  $\text{CaCO}_3$  为主要成分的颗石层, 在全球碳沉降中起到重要作用<sup>[1]</sup>。颗石藻增殖和形成水华过程中可以释放大量挥发性的二甲基硫 (DMS) 和丙烯酸, 是影响气候、特别是区域性环境效应的重要物质<sup>[2-4]</sup>。暴发颗石藻水华时大量的  $\text{CaCO}_3$  颗石粒形成强烈的反光层<sup>[5]</sup>, 使底部生物的光照受到限制; 另一方面, 在围塘和内湾环境中易形成恶性的水质的种类, 则可以通过暴发增殖形成对海域环境、区域性气候、环境生态等方面造成影响。具有毒性的颗石藻同样影响到海水养殖业和人类安全<sup>[6]</sup>, 因此, 颗石藻成为海洋环境科学研究的重要对象之一<sup>[7]</sup>。同时, 作为一种具有多领域利用价值的资源生物, 颗石藻又引起广泛重视, 是生物矿化基础研究<sup>[8-9]</sup>的良好材料, 也是作为以人类食用或养殖动物饵料为目标进行研究和应用的对象<sup>[10-12]</sup>。因此, 对区域性原生颗石藻种类的特征界定有重要的意义。

虾塘养殖模式下, 常出现一种水面浮沫的长期恶性的水质, 但对其中浮游植物原因种的研究相对缺乏。2004年11月间, 浙江省象山港虾塘中出现维持时间很长的浮沫状恶性的水质, 导致养殖蟹全部死亡。采浮沫处水样观察发现, 其优势种类为一种颗石藻。我国境内有关颗石藻水华的报道较

少。本文报道了从象山港虾塘藻类水华中分离纯化之活体颗石藻特征界定相关的研究结果, 包括该种的细胞显微观察, 细胞脂肪酸和甾醇特征检测, 基于 18S rDNA 基因检测的系统发生探讨。鉴于该种藻华致死养殖生物的作用, 我们还通过对卤虫的致死效应初步检测了该藻的毒性特征。以期为针对颗石藻在环境科学基础研究和生物资源应用研究方面提供参考。

### 1 材料与方法

**1.1 藻种及培养** 采自浙江省象山南田塘虾塘, 以毛细管法分离单细胞, 于 24 孔组织培养板 (COSTAR, Coming Incorporated, USA) 上微量培养至较高密度后, 转移到 250mL 三角烧瓶中进行单种静置培养和保种, 种质编号为 NMB-jh026, 室内保种于 20℃, 40 μmol/m<sup>2</sup>• s (D:L=12:12) 条件下。保种和实验均为非无菌单种培养, 培养液均采用 NMB<sup>3</sup> 培养液<sup>[13]</sup>, 实验均在 GXZ 型智能光照培养箱 (宁波江南仪器厂) 中进行。

**1.2 细胞显微观察** 于 Olympus 光学显微镜下观察。细胞大小测试: 以福尔马林固定指数生长期细胞, 于光学显微镜下测 100 个细胞大小, 取平均值。扫描电镜观察指数生长期细胞, 按照常用的固定、程序脱水、置换和干燥过程进行, 于

收稿日期: 2007-03-29 修订日期: 2008-01-12

基金项目: 欧盟合作研究项目 (NCO-CT-2004-510706); 教育部新世纪人才支持计划 (NECT-04-0555); 教育部“高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目”(705028); 国家自然科学基金项目 (40776064)资助

通讯作者: 周成旭 (1968—), 女, 四川什邡人; 副研究员, 硕士; 主要从事海洋浮游植物生物学及生理生态学研究。Tel 0574-87600556

E-mail zhouchengxu@nbu.edu.cn

日立 S3400 扫描电子显微镜下观察拍照。生活细胞状态观察则是在 24 孔组织培养板上培养, 于 Nikon 倒置显微镜下每天镜检, 作定性记录。

**1.3 18S rDNA 基因检测** 取 1.0mL 指数生长期藻细胞, 提取藻细胞基因组 DNA, 进行 PCR 扩增 (GeneAmp PCR system 2400, PerkinElmer)。用 Biospin GelExtraction 试剂盒进行 PCR 产物的回收, 回收 PCR 产物与 pMD 18-T 载体 (大连宝生物) 连接后转化感受态 *E. coli* JM109 中。挑菌落用通用引物对其进行 PCR 扩增以检测重组子, 将扩大培养后的重组菌落送去测序 (北京三博远志生物技术有限公司)。

所用引物: KE5 5-AAGCCATGCATGCTAACTAT-3' KE3 5-TGATAAGGTTYGGACARCTTC-3' 其中兼并碱基代码 Y = C/T; R = A/G。

**1.4 脂肪酸甾醇检测** 参考文献 [14]。

**1.5 对卤虫无节幼虫的毒性检测** 取指数生长后期颗石藻液 ( $2.75 \times 10^5$  cells/mL) (AC), 经 5000 r/m 离心 10min 后, 上清液作为去藻上清液 (CFCS), 沉淀物用消毒海水重新悬浮至原藻液体积, 超声破碎后, 15000 r/m 离心 10min, 取上清液作为超声破碎细胞提取液 (URCS), 沉淀物以消毒海水重新悬浮到原体积, 作为超声破碎细胞碎片悬浮液 (CDS) 用于实验。以卤虫培养中常用饵料藻金藻 (*Isochrysis* sp., 3011 密度为  $2.5 \times 10^5$  cells/mL) 藻液作为喂养对照组, 以消毒海水 (DSW) 作为空白对照组。毒性检测方法: 于 24 孔组织培养板板孔中加入 2mL 上述检测对象, 各孔加入 1 日龄卤虫幼虫 20 尾 (以 10μL 的移液器一次取一尾), 三个平行。环境条件: 光

照培养箱中,  $20^\circ\text{C}$ ,  $37-55.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  (D:L = 12:12)。分别于 1, 3, 5, 24, 48, 72, 96h 在倒置显微镜下检测卤虫死亡数 (视完全不活动为死亡)。

以三组死亡率平均值计算致死效率。死亡率 = (死亡数 / 20) × 100%。

## 2 结 果

### 2.1 细胞显微观察

光学显微镜下观测显示, 该颗石藻细胞近球形, 细胞直径约  $12.5 \mu\text{m}$ , 光学显微镜下即可观察到明显的钙壳 (图版 I - A)。游泳细胞具双鞭毛, 长度近 2 倍细胞直径。生长至后期或营养盐低下时, 细胞沉底鞭毛脱落, 部分细胞膨大 (图版 I - B), 在底栖阶段可形成无钙壳的丝状体 (图版 I - C)。沉底的球形或丝状体细胞, 在重新接种新鲜培养液后, 可重新形成钙壳细胞。观察发现, 沉底的钙壳细胞在营养盐恢复后的 2h 内就可以重新成为游泳细胞。扫描电子显微镜观测显示, 细胞表面钙壳层为同类颗粒组成 (图版 I - D), 颗粒椭圆环状, 远细胞表面观有齿状突起, 环上有规则排列的圆点, 向细胞内表面环面观光滑, 电镜下观察可见, 颗粒是由更小单位的结构嵌合成环的, 环侧面观有两层片突出 (图版 I - E, F)。

### 2.2 18S rDNA 基因检测

本种质在 GenBank 中的登录号为 EF208116, 表 1 是用 Blast 进行 18S rDNA 序列比对结果, 与 *Pleurochrysis* 属一些种类相比较, 在 1700 多的碱基中有 99% 的相似度。

表 1 用 Blast 进行 18S rDNA 序列比对结果

Tab. 1 The results of the Blast of 18S rDNA sequence

藻种 Species	登录号 Accession no	碱基对长度 Score	相似度 Identity
<i>Pleurochrysis</i> sp.	AB183616.1	3378 bits (1704)	99%
<i>Pleurochrysis dentata</i>	AJ544121.1	3370 bits (1700)	99%
<i>Pleurochrysis carterae</i>	AJ544120.1	3277 bits (1653)	99%
<i>Pleurochrysis</i> sp.	AB183596.1	3269 bits (1649)	99%

从 GeneBank 检索的几个 *Pleurochrysis* 属种类和定鞭藻其他种类的系统发生分析结果如图 1, 本颗石藻与 *Pleurochrysis* 属的种类归于一处。

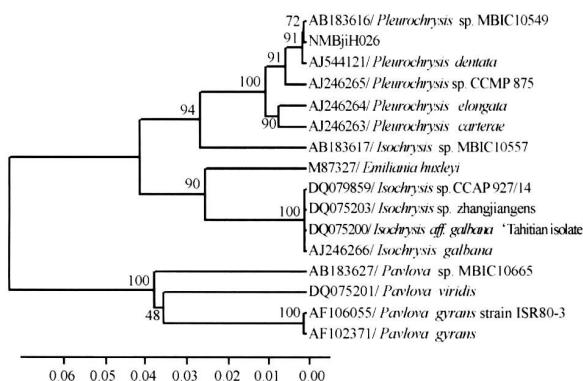


图 1 基于最大相似性分析的系统发生树

Fig. 1 Phylogenetic tree based upon a maximum likelihood analysis

### 2.3 脂肪酸和甾醇检测

对平台期颗石藻细胞脂肪酸和甾醇测试结果 (表 2)。

表 2 象山港一种颗石藻的脂肪酸和甾醇组成

Tab. 2 The composition of fatty acids and sterols in *Pleurochrysis* sp. from Xiangshan Bay

脂肪酸组成 Lipid compounds	R. T. (min)	%
C14: 0	7.842	1.27
Unknown fatty acid	8.55	0.2
C15: 0	9.167	0.39
C16: 0	10.885	41.51
C16: 1 (n-7)	11.083	10.46
C16: 2 (n-4)	11.652	3.65
C18: 0	14.913	3.33
C18: 1 (n-9)	15.01	8.79

续表

脂肪酸组成 Lipid compounds	R. T. (min)	%
C18 1( n- 7)	15. 124	3. 2
C18 2( n- 6)	15. 406	5. 22
C18 3( n- 3)	16. 018	8. 27
C18 4( n- 3)	16. 155	10. 06
Campesterol (C28 2/5 22/24M e)	35. 581	1. 74
unknown sterol	37. 965	0. 9
Stigmastanol (C29 2/5, 22/24Ethyl)	39. 283	1. 01

从该颗石藻的脂肪酸气相色谱质谱的总离子流图中可以看到, 颗石藻的脂肪酸种类数量较少, 仅有 12 个可以分辨的峰, 经过质谱数据的分析鉴定, 分别为: 十四烷酸 (1.27%, 相对百分含量, 以下同)、十五烷酸 (0.39%)、十六烷酸 (41.51%)、十六碳单烯酸 (10.46%)、十六碳二烯酸 (3.65%)、十八烷酸 (3.33%)、十八碳单烯酸 (11.99%)、十八碳二烯酸 (5.22%)、十八碳三烯酸 (8.27%)、十八碳四烯酸 (10.06%)。而二十碳链长以上的脂肪酸竟然不存在。其最主要的脂肪酸是十六烷酸, 这个脂肪酸通常是脂肪酸合成酶的第一个合成物质, 也是所有更高级脂肪酸的生物合成前体, 含量次高的脂肪酸是十六烷单烯酸, 以及十八碳三烯酸和十八碳四烯酸。

在颗石藻中共鉴定出三个甾醇类物质, 分别为 24 甲基-5, 22-二烯胆固醇 (菜子甾醇)、24 乙基-5, 22-二烯胆固醇 (豆甾醇), 另外一个结构为 24 乙基-5-烯胆固醇 (或 24 乙基-22-烯胆固醇)。

#### 2.4 对卤虫无节幼虫的毒性检测

从该颗石藻的不同处理部分的被检液毒性实验发现, 相对于喂养对照组和空白对照组而言, 各部分对卤虫无节幼虫均有大小不等的致死作用。其中, CDS 表现出较明显的急性致死作用, 于实验后 3h 即表现出 1.5% 的致死率, 48h 达到 88% 的致死率, 96h 致死率达 100%; AC 48h 致死率达 50% 以上, 96h 致死率为 95%。CFCS 和 URCS 的毒性相对较小, 但于 48h 表现出致死作用, 96h 的致死率已达 70%—80%。喂养对照组 (3011) 中死亡率最低, 消毒海水对照组 (DSW) 中, 48h 以后出现略大于喂养组的死亡率, 96h 死亡率近 30%, 但均明显低于颗石藻造成的死亡率 (图 2)。

### 3 讨论

颗石藻在地球上出现的最早记录可以早至石炭纪, 其  $\text{CaCO}_3$  钙壳构造是保存较好的藻类化石记录<sup>[15, 16]</sup>。现代海洋中, 颗石藻仍然是海洋和咸水水域的重要生物, 在全球或区域性气候、物质循环和海洋环境等方面产生重要影响, 是环境科学、生物技术和材料科学等重要的研究对象。

我国对生活颗石藻的文献报道中, 研究的大多不是我国海域原生颗石藻种<sup>[17—19]</sup>, 尚未见针对颗石藻水华特征种的系统研究, 对颗石藻的毒性界定更处空白。

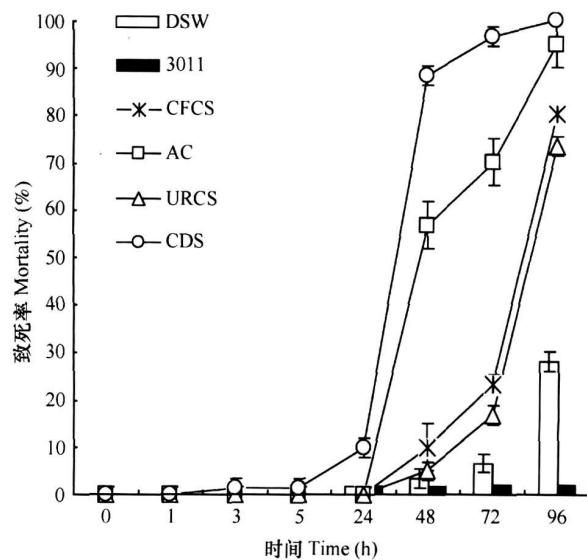


图 2 颗石藻不同处理液对卤虫无节幼虫的致死率

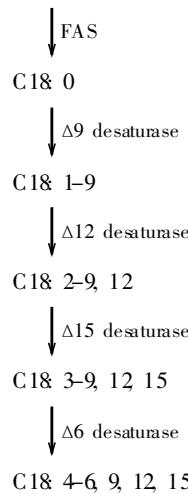
Fig 2 The mortalities of *Artemia salina* nauplii under the effects of the suspensions of different parts of *Pleurochrysis* sp. cultures.  
URCS: 超声破碎细胞提取液 Ultrasonic ruptured cell suspensions CFCS: 去藻上清液 Cell free culture supernatants AC: 藻液 Algae culture  
CDS: 超声破碎细胞碎片悬浮液 Cell debris suspension 3011: 金藻 3011 喂养对照组 *Isodrysis* sp. (3011) as feeding control DSW: 消毒海水空白对照组 Distilled sea water control

由于现代海洋中对生活颗石藻深入研究的资料相对缺乏, 而且不同的颗石藻在其颗石粒特征上表现显著的差异, 因此, 对颗石藻的分类界定很大一部分依赖于对颗石粒的形态特征分析<sup>[20]</sup>。从本文的实验结果来看, 采自象山港的颗石藻具有明显的钙壳结构, 细胞表面覆盖同型颗石粒, 颗石粒为椭圆环粒 (Cricolih), 该颗石粒的扫描电镜结构与 Marsh 观察的 *Pleurochrysis cartenae* 结果相似<sup>[21, 22]</sup>。对生活细胞连续显微观察发现, 底栖阶段出现的无钙壳分枝丝状体, 是 *Pleurochrysis* 属的典型特征<sup>[20]</sup>。该种 18S rDNA 序列比对结果和系统发生分析也显示为 *Pleurochrysis* 属种类。

现代的科学的研究中, 对微藻新种类界定或重要种类的重新鉴定往往需要借助多种技术手段。颗石藻类群中, *Emiliania huxleyi* 是常于高纬度发生大面积水华的种类, 因此对它的研究也比较深入。对 *E. huxleyi* 和其他的几种定鞭藻纲微藻的脂类物质分析发现, 脂类物质的特征在种类界定方面也是可行的指标之一<sup>[23, 24]</sup>, 已被应用到微藻的化学分类法上面<sup>[25]</sup>。从本研究的检测结果来看, 该颗石藻脂肪酸的主要特征与金藻最为接近, 但是多数金藻都具有一定数量的二十碳五烯酸 (EPA) 和二十二碳六烯酸 (DHA)。其脂肪酸与褐藻、硅藻、绿藻的脂肪酸特征也较为接近, 但褐藻与硅藻通常也含有 EPA, 绿藻中则通常不存在十八碳四烯酸。

Guschina 和 Hawwood<sup>[26]</sup>指出, 根据各个脂肪酸碳数与不饱和键的位置关系, 可以看出脂肪酸的生物合成途径中的

相互关系。在本研究的颗粒石藻中, 其十八碳脂肪酸之间具有非常明确的不饱和度递增关系, 从饱和型的十八烷酸开始, 到n-9单烯、n-6双烯、n-3三烯、n-3四烯, 根据这些结构关系可以推导出十八碳脂肪酸在颗粒石藻中的生物合成途径如下图。



颗粒石藻中十八碳脂肪酸的生物合成途径推导

从该颗粒石藻中鉴定出的三个甾醇物质是金藻纲的特征脂类<sup>[27]</sup>, 本研究结果也与 Ghosh P<sup>[28]</sup>从 *Pleurochrysis carterae* 中分析得到的结果一致。

Houdan A. et al.<sup>[6]</sup>的研究表明, *Pleurochrysis carterae* 对卤虫无节幼虫有明显的密度相关的致死效应, 而本文中基因测序与之相近的 *Pleurochrysis dentata* 对卤虫幼虫没有致死效应(致死率为0)。*P. carterae* 快速生长期和平台期的 LD<sub>50</sub>相近, 但有时间的差异, 高密度平台期的 *P. carterae*(10<sup>6</sup> cells/mL) 24 h 全部致死幼虫。从本研究对卤虫无节幼虫的毒性检测结果来看, 实验所用的指数生长后期藻液密度为 10<sup>5</sup> cells/mL, 在 96 h 出现 100% 致死率。针对不同处理的悬浮液的检测还发现, 该颗粒石藻的藻液(AC)、胞外培养液(CF-CS)和结构物质(CDS URCS)均有不同程度的卤虫致死效应。由于喂养对照组和空白对照组中卤虫死亡率均较低, 可以排除 AC 或 CDS 造成高致死率原因中卤虫缺氧或饥饿的因素。从本文述及的颗粒石藻水华致死全部塘中养殖蟹事实, 说明此种水华有害, 其原因可能源于同样的毒性。具体的致毒机理尚需深入研究。

根据采样水体的浮沫状恶臭水质的特征, 结合细胞形态观察, 生活细胞跟踪观察, 18S rDNA 序列分析, 细胞脂肪酸和甾醇及其毒性的初步检测, 我们认为, 浙江象山港虾塘的颗粒石藻为 *Pleurochrysis carterae*, 是一种容易在内湾或养殖塘中形成水华的颗粒石藻种类, 这是我国养殖环境中首次对颗粒石藻水华及其特征研究的报道。

#### 致谢:

本文电镜照片由宁波生命学院余红卫老师协助拍摄, 本室骆其君老师野外采样, 在此表示衷心感谢。

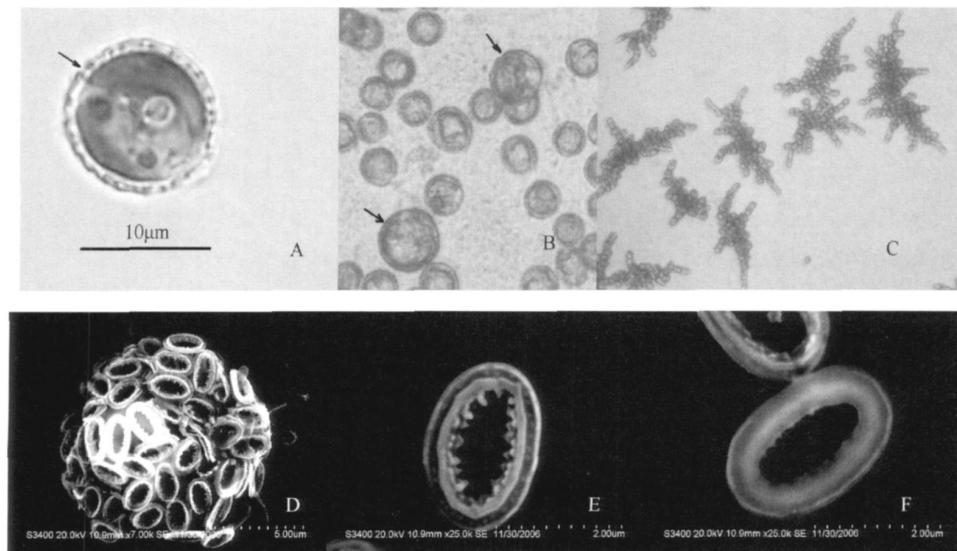
#### 参考文献:

- [1] Graham L E, Wilcox L W. Algae [M]. New Jersey: Prentice

Hall 2000, 180—197

- [2] Balch W M, Elphinstone K. Calcification rates in the equatorial Pacific along 140°W [J]. Deep Sea Research, 1995, 43: 971—993
- [3] Brown C W, Yador J A. Coccolithophorid blooms in the global ocean [J]. Journal of Geophysical Research, 1994, 99(4): 7467—7482
- [4] Dacey JW H, King G M, Wakeham S G. Factors controlling emission of dimethylsulfide from salt marshes [J]. Nature, 1987, 330: 643—645
- [5] Tyrrell T, Taylor A H. A modeling study of *Emiliania huxleyi* in the NE Atlantic [J]. Journal of Marine Systems, 1996, 9(1/2): 83—112
- [6] Houdan A, Bonnard A, Fresnel J et al. Toxicity of coastal coccolithophores (Prymnesiophyceae, Haptophyta) [J]. Journal of Plankton Research, 2004, 26(8): 875—883
- [7] Hou K, Chen Z D, Chen Y C, et al. Coccolith and environment [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2001, 10(1): 51—53 [侯奎, 陈镇东, 陈延成, 等. 颗粒石藻与环境. 植物资源与环境学报, 2001, 10(1): 51—53]
- [8] Marsh M E. Polyanions in the CaCO<sub>3</sub> mineralization of coccolithophore [A]. In: Baeruerlein E (Eds.), Biominerization from biology to biotechnology and medical application [M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2000: 251—268
- [9] Marsh M E. Regulation of CaCO<sub>3</sub> formation in coccolithophore [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2003, 136B: 743—754
- [10] Mohemani N R, Borowitzka M A. The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds [J]. Journal of Applied Phycology, 2006, 18: 703—712
- [11] Gao Q T, Chen Q Y. A kind of marine planktonic microalgae of potential development—*Pleurochrysis carterae* [J]. Marine Lake Salt and Chemical Industry, 2000, 29(5): 26—29 [高清潭, 陈庆亚. 一种具有开发潜力的微藻—圆石藻. 海湖盐与化工, 2000, 29(5): 26—29]
- [12] Miyamoto E, Watanabe F, Ebara S, et al. Characterization of a vitamin B<sub>12</sub> compound from unicellular coccolithophorid alga (*Pleurochrysis carterae*) [J]. Journal of Agricultural and Chemical Sciences, 2001, 49: 3486—3489
- [13] Zhou C X, Ma B, Wang F X, et al. The population growth and variation of nitrate-N and phosphate-P in the microculture of *Phaeodactylum tricornutum* Bohl and *Prochlorococcus micans* [J]. Marine Science, 2006, 30(12): 58—61 [周成旭, 马斌, 汪飞雄, 等. 海洋原甲藻与三角褐指藻混合培养条件下的种群生长与氮磷营养盐变化. 海洋科学, 2006, 30(12): 58—61]
- [14] Xu J L, Yan X J, Zhu Y F, et al. Analysis of fatty acids and sterols in a marine feed microalga and its potential chemotaxonomic significance [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2005, 27(4): 121—126 [徐继林, 严小军, 朱艺峰, 等. 一种饵料微藻的脂肪酸甾醇分析及化学分类的探讨. 海洋学报, 2005, 27(4): 121—126]
- [15] Hou K. Coccolithophorids in proterozoic and paleozoic in China [M]. Beijing: Ocean Press, 1999 [侯奎. 中国元古代古生代的颗粒石藻. 北京: 海洋出版社, 1999]

- [ 16] Liu Z L. Fossil phycoLOGY [M]. Beijing High Education Publishing House 1990 [刘志礼. 化石藻类学导论. 北京: 高等教育出版社. 1990]
- [ 17] Gao Q T, Chen M Z. Primary studies on the growing conditions of *P laurochrysis carterae* [J]. *Marine Lake Salt and Chemical Industry*, 1999, 28(5): 23—26 [高清潭, 陈慕钊. 园石藻培养条件的初步研究. 海湖盐与化工, 1999, 28(5): 23—26]
- [ 18] Zhang W J, Shi D J, Guo L C, et al. Effects of three nutrition salts on growth of *P leurodrys is carterae* [J]. *Marine Lake Salt and Chemical Industry*, 2004, 33(6): 16—19 [张文俊, 施定基, 郭连城, 等. 三种营养盐对颗粒石藻生物量的影响. 海湖盐与化工, 2004, 33(6): 16—19]
- [ 19] Wu Q Y, Shiraiwa Y. Effect of  $\text{HCO}_3^-$  on surface calcification and  $\text{CO}_2$  fixation in marine *Emiliania huxleyi* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 13(41): 285—289 [吴庆余, 白岩善博.  $\text{HCO}_3^-$  对海生颗粒石藻细胞表面钙化和  $\text{CO}_2$  固定作用的研究. 植物学报, 1999, 13(41): 285—289]
- [ 20] Heimdal B R. Modem coccolithophorids [A]. In: Tomas C R (Ed), Identification marine phytoplankton [M]. California: Academic Press 1997, 731—831
- [ 21] Marsh M E, Chang D K, King G C. Isolation and characterization of a novel acidic polysaccharide containing tartrate and glyoxylate residues from the mineralized scales of a unicellular coccolithophorid alga *P leurodrys is carterae* [J]. *Journal Biological Chemistry*, 1992, 267(28): 20507—20512
- [ 22] Marsh M E. Coccolith crystals of *P laurochrysis carterae*: crystallographic faces, organization, and development [J]. *Protoplasma*, 1999, 207: 5446
- [ 23] Volkman JK, Smith D J, Eglington G, et al. Sterol and fatty acid composition of four marine haptophycean algae [J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1981, 61: 509—527
- [ 24] Marlowe I T, Green J C, Neal A C, et al. Long chain ( $n$ -C<sub>37</sub>—C<sub>39</sub>) alkenones in the Prymnesiophyceae. Distribution of alkenones and other lipids and their taxonomic significance [J]. *British Phycological Journal*, 1984, 19: 203—216
- [ 25] Xu J L, Yan X J. Research progress of microalgal chemotaxonomy using lipid analysis [J]. *Marine Science Bulletin*, 2004, 23(2): 65—72 [徐继林, 严小军. 脂类分析在海洋微藻化学分类学上的研究进展. 海洋通报, 2004, 23(2): 65—72]
- [ 26] Guschina I A, Hawood J L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae [J]. *Progress in Lipid Research*, 2006, 45: 160—186
- [ 27] Volkman JK. Sterols in microorganisms [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2003, 60: 495—506
- [ 28] Ghosh P, Patterson G W, Wikfors G H. Sterols of some marine prymnesiophyceae [J]. *J Phycol*, 1998, 34(3): 511—514



图版I Plate

- A. 光学显微镜下观察可见明显钙壳层(箭头); B. 沉底鞭毛脱落细胞(箭头示膨大细胞); C. 底栖分枝丝状体;  
D. 细胞外颗粒石层的扫描电镜照片; E. 颗粒石粒远细胞表面观; F. 颗粒石粒近细胞表面观
- A. the extracellular coccoliths (arrow) observed under the light microscope; B. benthic cells without flagella and enlarged cells (arrow); C. filamentous benthic stage; D. the extracellular coccoliths observed under SEM; E. the criolith surface facing to the outside of the cell surface; F. the criolith facing the cell surface