

棕鞭毛虫牧食作用对铜绿微囊藻形态和生理特性的影响*

杨 州^{1,2}, 孔繁翔², 史小丽², 张 氏², 曹焕生²

(1: 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046)

(2: 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

摘 要: 在纯培养的铜绿微囊藻种群中添加有效牧食者棕鞭毛虫, 进行为期 9d 的实验, 用流式细胞仪检测棕鞭毛虫牧食作用对铜绿微囊藻的影响。结果表明棕鞭毛虫的牧食导致微囊藻种群迅速下降, 同时微囊藻种群出现了群体形成现象。棕鞭毛虫直接牧食作用诱发微囊藻形成群体后, 能在一定程度上能防御棕鞭毛虫的进一步牧食, 使得种群得以延续。在棕鞭毛虫的牧食作用下, 以酯酶活性和叶绿素荧光强度为代表的微囊藻细胞活性在实验后期显著增强。而牧食处理后细胞尺寸有所变小, 这可能是伴随着微囊藻诱发性群体形成过程中一种生态对策的调整, 保持较小的个体有利于种群的迅速增殖。

关键词: 棕鞭毛虫; 铜绿微囊藻; 群体形成; 酯酶活性; 叶绿素; 细胞尺寸

Grazing effect of *Ochromonas* sp. on morphological and physiological characteristics of *Microcystis aeruginosa*

YANG Zhou^{1,2}, KONG Fanxiang², SHI Xiaoli², ZHANG Min² & CAO Huansheng²

(1: School of Biological Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, P.R.China)

(2: Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P.R.China)

Abstract: In laboratory culture *Microcystis aeruginosa* occurs mainly as single cells but under natural conditions, it is normally in the colonial morph. This phenomenon suggests that some factors may be responsible for the occurrence of colonies in lakes. In the present experiment we investigated the grazing effect of flagellate *Ochromonas* sp. on physiological changes in *M. aeruginosa* using flow cytometry. The experiment was run in triplicate for 9 days at 25°C in photoperiod of 12L:12D. Results showed that *M. aeruginosa* population exposed to flagellate grazing decreased sharply and some single cells formed colonies, most of which were made up of several or dozens of cells. Colony formation can deter flagellate from further grazing on a certain extent. Esterase activity and chlorophyll fluorescence of *M. aeruginosa* cells under flagellate grazing were significantly higher than those of unicells in the control, whereas the cell size of *M. aeruginosa* became smaller under intense flagellate grazing. The enhanced esterase activity may contribute to colony formation. The fact that cell size of *M. aeruginosa* under flagellate grazing became smaller may indicate that *M. aeruginosa* adopt a kind of ecological strategy to grow rapidly under intensive grazing.

Keywords: Flagellate *Ochromonas* sp.; *Microcystis aeruginosa*; colony formation; esterase activity; chlorophyll; cell size

微囊藻是一类全球性分布的蓝藻。蓝藻又称蓝细菌, 是地球上最早出现的光合自养生物, 在长期的进化过程中, 这类生物发展了一套独特的形态和生理生化机制, 能够在各种不同生境包括极端恶劣的环境中繁衍, 使其比其他生物具有一定的生存优势^[1]。在环境条件适宜时, 某些蓝藻能快速生长, 当达到一定生物量时, 这些藻类在水体表层大量聚集, 形成肉眼可见的藻类聚集体, 即蓝藻水华。近年来, 欧美等水环境治理较好的国家中蓝藻水华又有重新抬头之势, 许多发展中国家蓝藻水华的发生频率呈不断增加的趋势, 蓝藻水华引起的一系列环境和健康问题正受到全世界各国的高度重视。其中的铜绿微囊藻, 常常

* 国家自然科学基金项目(30670404, 30400062)、江苏省自然科学基金项目(BK2007743)和国家重点基础研究发展计划项目(2002CB412305)联合资助。2007-07-27 收稿; 2007-11-12 收修改稿。扬州, 男, 1971 年生, 博士, 副教授; E-mail: yangzhou@njnu.edu.cn.

在我国大多数的浅水湖泊中聚积成很大的群体而形成有毒水华, 而通过分离纯化转入实验室培养基纯培养后, 这种群体形态往往消失^[2], 尽管其生物量达到很大, 却仍保持单细胞形态, 难以恢复野外水华的群体特征, 目前对于微囊藻这种表型变化的机制还缺乏足够的认识. 我们曾从种间关系角度探讨了微囊藻群体形成的原因, 推测群体形成可能是微囊藻防御牧食的策略之一, 并开展了一系列研究^[3-4]. 结果发现, 后生浮游动物的牧食不能诱发单细胞微囊藻形成群体^[5-6], 而原生动物棕鞭毛虫 (*Ochromonas* sp.) 的牧食能诱发单细胞微囊藻重新形成由数十个到数百个细胞组成的防御性群体^[6], 能在一定程度上阻止棕鞭毛虫的进一步牧食, 与 Burkert 等的一个偶然发现相一致^[7]. 微囊藻重新形成群体后, 相对于原先的单细胞, 在细胞表面超微结构以及胞外多糖含量出现了明显的变化^[8]. 可以进一步推测, 在伴随着群体形成的过程中, 微囊藻细胞的活性可能也会发生相应的变化. 由于酯酶活性可以从整体上表征细胞的代谢活性, 叶绿素荧光强度可以表示相对叶绿素含量, 因而本文使用流式细胞仪可以快速检测经过棕鞭毛虫牧食后的铜绿微囊藻这些指标的可能变化, 并结合这些指标的变化分析了微囊藻的诱发性防御.

1 材料与方法

1.1 藻种来源及培养条件

有毒铜绿微囊藻由中国科学院水生生物研究所藻种库提供, 采用 BG-11 培养基^[9]培养, 培养温度为 25℃, 光照强度为 2200lx, 光照周期为 L:D=12:12.

1.2 浮游动物来源及其培养条件

试验用棕鞭毛虫 (*Ochromonas* sp.) 分离自太湖梅梁湾样品, 用经 60℃ 温水处理的大麦粒培养, 培养温度为 25℃, 室内自然光照强度及光周期.

1.3 直接牧食实验

取指数期铜绿微囊藻 100ml 置于 250ml 锥形瓶中, 加入棕鞭毛虫, 密度为 6000ind./ml. 棕鞭毛虫培养物在使用前 24h 加入适量浓度青霉素 (0.5mg/ml, Penicillin G Sodium Salt, Sigma) 和链霉素 (1mg/ml, Streptomycin Sulfate, BioSharp) 去除细菌. 对照组为不添加任何浮游动物的纯培养铜绿微囊藻, 铜绿微囊藻的初始密度为 5.53×10^6 cells/ml. 每组设 3 个重复, 置于 LRH-400-G 光照培养箱中, 试验条件同上, 每天定时对上述实验培养物摇匀 3 次, 试验为期 9d. 期间每隔一天取样一次, 在显微镜下计数、观察形成的群体并用蔡氏显微镜进行显微摄影.

1.4 流式细胞仪的检测

每两天对棕鞭毛虫牧食处理组和对照组的 3 个平行分别取样 2ml, 充分振荡后用 300 目网布过滤后, 用 FDA 对藻样进行染色后, 上流式细胞仪 (FACS Vantage SE, Becton Dickinson, USA) 进行检测. 通过 FDA (Fluorescein diacetate, Sigma, F-7378) 染色, 可以对铜绿微囊藻酯酶活性进行测定. 将 FDA 用丙酮稀释到 1mmol/L, -18℃ 保存. 染色条件为: FDA 浓度为 25μmol/L, 染色 8min. 流式细胞仪为双激光配置: 第一激光为 Coherent 水冷氩离子激光器 (激发波长为 488nm), 产生的荧光信号通过 2 个检测通道被收集 (FL1: 530/30nm, FDA 荧光; FL3: 675/20nm, 叶绿素 a 荧光). 检测指标分别为: FL1 (酯酶活性)、FL3 (叶绿素荧光强度) 和 FSC (细胞大小), 通过这些指标的检测判断微囊藻在棕鞭毛虫牧食压力下群体形成过程中藻细胞活性变化以及生理状况.

2 结果

2.1 棕鞭毛虫牧食对铜绿微囊藻形态的影响

在棕鞭毛虫直接牧食处理组中观察到了铜绿微囊藻有群体形成, 诱发形成的群体大多数仅有几个到几十个细胞构成 (图 1), 在有些锥形瓶底部还出现了聚合在一起的较大群体, 和以前观察的结果相似^[6].

2.2 铜绿微囊藻种群生物量的变化

在棕鞭毛虫牧食处理组中, 铜绿微囊藻种群逐渐下降, 从第 2d 起生物量就显著低于对照组 ($P < 0.05$, 图 2). 随着实验的进展, 对照组和棕鞭毛虫牧食处理组的微囊藻生物量差距越来越大. 但在实验临近结

束时, 对照组微囊藻种群基本不再增长, 接近饱和期, 而棕鞭毛虫牧食处理组的微囊藻种群也基本不再下降, 维持相对稳定的水平.

2.3 铜绿微囊藻酯酶活性(FL1)、叶绿素荧光强度(FL3)以及细胞大小(FSC)的变化

从图 3 可以看出, 加入棕鞭毛虫牧食的处理组 FL1 值波动很大, 从第 3d 开始高于对照组, 但直到第 7d, 牧食处理组和对照组才开始出现显著性差异($P=0.0291$), 至实验结束时处理组的 FL1 值远远高于对照组. 在棕鞭毛虫牧食的微囊藻中, FL3 也呈现逐步增高的态势, 随着实验的进展, 明显高于对照组, 到第 7d 时, 牧食处理组和对照组已呈现显著性差异(图 4, $P=0.0339$). FSC 值则与上述 2 个参数的结果相反, 实验期间, 棕鞭毛虫牧食处理组的 FSC 都低于对照组 FSC, 也是在实验的第 7d, 两者之间出现了显著性差异(图 5, $P=0.0012$).

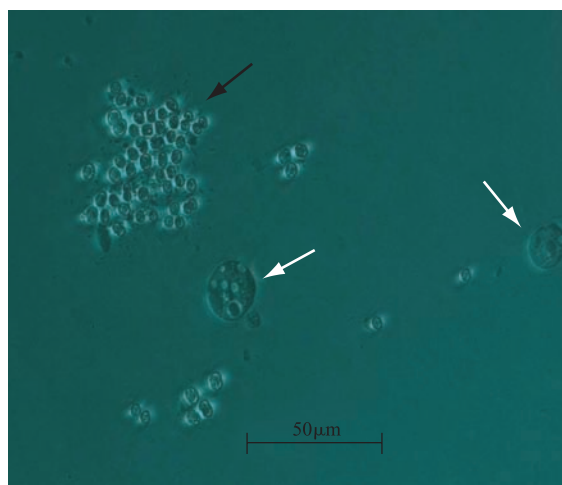


图 1 在棕鞭毛虫牧食处理组诱发的铜绿微囊藻群体(黑箭头所示为微囊藻群体, 白箭头所示为鞭毛虫)

Fig.1 Colony of *M. aeruginosa* induced in the treatment of flagellates grazing

The black arrow showed the colony of *M. aeruginosa*; the white arrows showed the flagellates

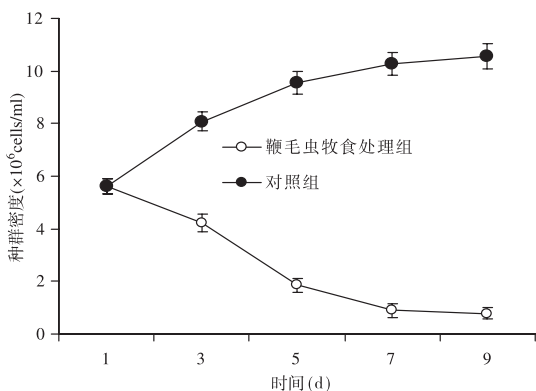


图 2 棕鞭毛虫牧食处理组和对照组铜绿微囊藻种群密度的动态变化

Fig.2 Dynamics of cell density of *M. aeruginosa* population in flagellate grazing treatment and the control

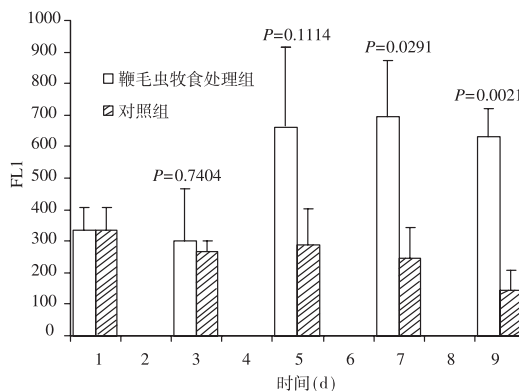


图 3 实验期间棕鞭毛虫牧食处理组和对照组铜绿微囊藻酯酶活性(FL1)的变化

Fig.3 Changes in esterase activity (FL1) of *Microcystis aeruginosa* in the flagellate grazing treatment and the control

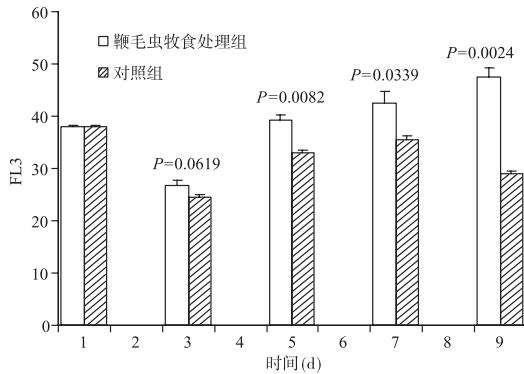


图4 实验期间棕鞭毛虫牧食处理组和对照组铜绿微囊藻叶绿素荧光强度(FL3)的变化

Fig.4 Changes in chlorophyll fluorescence (FL3) of *Microcystis aeruginosa* in the flagellate grazing treatment and the control

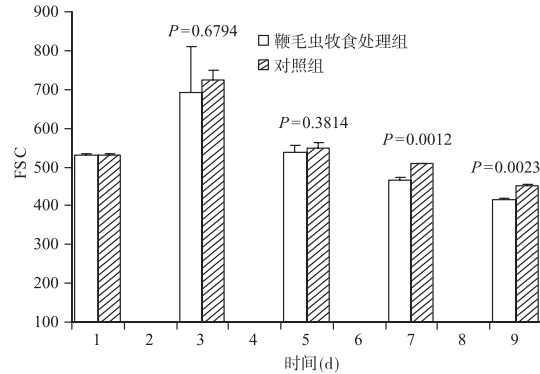


图5 实验期间棕鞭毛虫牧食处理组和对照组铜绿微囊藻细胞大小(FSC)的变化

Fig.5 Changes in cell size (FSC) of *Microcystis aeruginosa* in the flagellate grazing treatment and the control

3 讨论

3.1 棕鞭毛虫牧食对铜绿微囊藻形态的影响

铜绿微囊藻对棕鞭毛虫的强牧食压力作出了形成群体的响应表明,对于藻类而言降低被食风险的一种有效方法是在必要时能增加个体大小.在棕鞭毛虫牧食处理组中有大量群体形成的事实说明,棕鞭毛虫对单细胞铜绿微囊藻的牧食能诱发它们聚合形成较大的群体,铜绿微囊藻形成群体后能有效阻止棕鞭毛虫的进一步牧食,从而提高铜绿微囊藻的存活率,维持种群延续.我们认为这是铜绿微囊藻针对棕鞭毛虫牧食的一种防御策略,形成群体后个体变大超过棕鞭毛虫的摄食能力从而幸免被食得以生存下来,可以看作是对棕鞭毛虫有效牧食的诱发性防御反应.由于牧食是导致大多数生物种群下降的直接外部原因,很多生物通过进化多样化的防御机制来增加它们生存的机会.最常见的是基本性防御——生物呈现出稳定的防御特征不依赖于捕食风险大小.相比较而言,诱发性防御需要环境刺激来激活^[10],而且诱发性防御的主要益处是防御代价只有在需要时才会付出,也就是说存在真正的被捕食风险时才会产生^[10].很多研究表明^[10-20],在藻类中也广泛存在着诱发性防御.

尽管在本实验中使用的是有毒铜绿微囊藻,但棕鞭毛虫生长良好,说明对棕鞭毛虫没有毒效应.因而,对于铜绿微囊藻而言,形成群体可能是抵抗像棕鞭毛虫这类原生动物的唯一有效防御措施,因为毒素不能有效阻止棕鞭毛虫的牧食,这也许就是棕鞭毛虫能诱发微囊藻形成群体的原因^[6].

然而,在本实验中产生的微囊藻群体还比较小,还没有形成类似于发生在野外富营养化湖泊中的大群体,实验条件下诱发的群体在大小和形态上与采集自野外的群体都有明显差别^[6],诱发性群体不具备野外自然群体中明显的胶鞘,表明这种诱导作用是相当微弱的,较弱的诱发性效应可能是形成这样大的群体就足以阻止棕鞭毛虫的牧食,但更可能的原因是由于实验中采用的铜绿微囊藻是无菌纯培养的.另外,其它的非生物因素可能对铜绿微囊藻的群体形成也发挥着不同程度的作用,在野外环境下形成的铜绿微囊藻大群体可能是生物因素与非生物因素协同作用的结果,但还有待于进一步研究确认.

3.2 棕鞭毛虫牧食作用对铜绿微囊藻细胞大小以及活性的影响

酯酶的活性在多种生物体中被认为是敏感和可靠的毒理学指标,因而在流式细胞仪检测中被广泛应用. FDA 是一种合适的代谢探针,它容易被细胞吸收并被酯酶转化,得到的荧光能用于酯酶活性的检测. FDA 转化为荧光素的速率与光合作用和营养生长所受的限制有关^[21],从而可以利用这种测定来评估浮游生物的代谢活性^[22-24].在本研究中,棕鞭毛虫牧食处理组酯酶活性要高于对照组,在实验后期还出现了显著性差异,说明棕鞭毛虫的牧食激发了铜绿微囊藻细胞的活性,这种细胞活性的增强可能与细胞加强了胞

外多聚糖的合成与分泌而最终导致细胞形成群体有关, 因为藻细胞表面的多聚糖在藻细胞聚合形成群体上发挥着重要作用^[15,25-29], 先前的实验也证实, 微囊藻形成群体后胞外多聚糖含量相对于单细胞而言也确实显著增加^[8]. 细胞色素变化也是反映细胞生理状态的重要指标^[30], 棕鞭毛虫牧食激发了铜绿微囊藻细胞的活性增强, 也体现在叶绿素含量上. 代表细胞大小的 FSC 指标, 实验期间在棕鞭毛虫牧食处理组中的铜绿微囊藻细胞大小都低于对照组, 在实验后期还出现了显著性差异. 说明在棕鞭毛虫的强牧食压力下, 铜绿微囊藻保持较小的个体, 与外界环境的相对接触面积更大, 能更方便快捷地获得更多资源, 有利于种群的迅速增殖^[31-33], 这可能也是伴随着诱发性群体形成过程中一种生态对策的调整, 既可以使铜绿微囊藻个体免于被食, 也会以尽可能快的速率恢复种群增长. 本次实验结果相对于 Burkert 等^[7]的发现而言, 从更深层次地揭示了微囊藻细胞群体形成过程中一些相关内在指标的变化.

3.3 棕鞭毛虫牧食下铜绿微囊藻生物量的变化

从实验来看, 尽管铜绿微囊藻在棕鞭毛虫的牧食过程中形成了防御性群体, 但在棕鞭毛虫强有力的牧食压力下种群生物量显著下降, 当然, 如果不存在这种诱发性防御的话, 单细胞的铜绿微囊藻可能被消灭殆尽. 从这个实验中, 一方面看到了铜绿微囊藻诱发性群体形成的有效防御, 也看到了铜绿微囊藻确实能被棕鞭毛虫大量消耗, 结合其它可摄食微囊藻的鞭毛虫^[34], 这些原生动物具有应用于富营养化水体中早期控制微囊藻种群的可能. 对于一种藻类水华的发展, 它的生长率必须超过所有损耗的总和. 在这些损失过程中, 牧食通常被认为是一个最重要的因素之一. 然而, 如果一种藻类很难被牧食, 例如由于特别的防御机制或诱发性防御机制降低了牧食压力, 这将有助于水华形成^[35]. 因此, 在大规模培养的有效牧食者可以成功地应用于野外之前, 还有很多基础研究需要探讨, 以便更好地了解微藻水华种类和浮游动物牧食者之间物种特异性相互作用的生物和环境调控机制.

4 参考文献

- [1] Bianchi TS, Westman P, Rolff C *et al.* Cyanobacterial blooms in the Baltic Sea: Natural or human-induced? *Limnology and Oceanography*, 2000, **45**: 716-726.
- [2] Bolch CJS, Blackburn SI. Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kütz. *Journal Applied Phycology*, 1996, **8**: 5-13.
- [3] Yang Z, Kong FX, Shi XL. Effects of filtered lake water on colony formation and growth rate in *Microcystis aeruginosa* of different physiological phases. *Journal of Freshwater Ecology*, 2005, **20**: 425-429.
- [4] Yang Z, Kong FX, Cao HS *et al.* Observation on colony formation of *Microcystis aeruginosa* induced by filtered lake water under laboratory conditions. *Annales de Limnologie – International Journal of Limnology*, 2005, **41**: 169-173.
- [5] Yang Z, Kong FX, Shi XL *et al.* Differences in response to rotifer *Brachionus urceus* culture media filtrate between *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Freshwater Ecology*, 2006, **21**(2): 209-214.
- [6] Yang Z, Kong FX, Shi XL *et al.* Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton. *Hydrobiologia*, 2006, **563**: 225-230.
- [7] Burkert U, Hyenstrand P, Drakare S *et al.* Effects of the mixotrophic flagellate *Ochromonas* sp. on colony formation in *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Ecology*, 2001, **35**: 9-17.
- [8] Yang Z, Kong FX, Shi XL *et al.* Changes in the morphology and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* (CYANOBACTERIA) during flagellate grazing. *Journal of Phycology*, 2008, **44**(3): in press.
- [9] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 1979, **111**: 1-61.
- [10] Harvell CD. The ecology and evolution of inducible defenses. *The Quarterly Review of Biology*, 1990, **65**: 323-340.
- [11] Hessen DO, van Donk E. Morphological-changes in *Scenedesmus* induced by substances released from Daphnia. *Archiv Für Hydrobiologie*, 1993, **127**: 129-140.
- [12] Lüring M, van Donk E. Zooplankton-induced unicellcolony transformation in *Scenedesmus acutus* and its effect on growth of herbivore Daphnia. *Oecologia*, 1996, **108**: 432-437.

- [13] Fialkowska E, Pajdak-Stós A. Inducible defence against a ciliate grazer *Pseudomicrothorax dubius*, in two strains of *Phormidium* (cyanobacteria). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1997, **264**: 937-941.
- [14] Boraas ME, Seale DB, Boxhorn JE. Phagotrophy by a flagellate selects for colonial prey: A possible origin of multicellularity. *Evolutionary Ecology*, 1998, **12**: 153-164.
- [15] Pajdak-Stós A, Fialkowska E, Fyda J. *Phormidium autumnale* (Cyanobacteria) defense against three ciliate grazer species. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, **23**: 237-244.
- [16] Jakobsen HH, Tang KW. Effects of protozoan grazing on colony formation in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) and the potential costs and benefits. *Aquatic Microbial Ecology*, 2002, **27**: 261-273.
- [17] Tang KW. Grazing and colony size development in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae): the role of a chemical signal. *Journal of Plankton Research*, 2003, **25**: 831-842.
- [18] Lürling M. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 2003, **39**: 85-101.
- [19] van Holthoorn FL, van Beek TA, Lürling M *et al.* Colony formation in *Scenedesmus*: a literature overview and further steps towards the chemical characterisation of the *Daphnia* kairomone. *Hydrobiologia*, 2003, **491**: 241-254.
- [20] Wiltshire K, Boersma M, Meyer B. Grazer-induced changes in the desmid *Staurastrum*. *Hydrobiologia*, 2003, **491**: 255-260.
- [21] Brookes JD, Geary SM, Ganf GG *et al.* Use of FDA and flow cytometry to assess metabolic activity as an indicator of nutrient status in phytoplankton. *Marine and Freshwater Research*, 2000, **51** (8): 817-823.
- [22] Tanaka Y, Yamaguchi N, Nasu M. Viability of *Escherichia coli* O157: H7 in natural river water determined by the use of flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **88** (2): 228-236.
- [23] Lage OM, Sansonetty F, O'Connor JE *et al.* Flow cytometric analysis of chronic and acute toxicity of copper(II) on the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Cytometry*, 2001, **44** (3): 226-235.
- [24] Regel RH, Ferris JM, Ganf GG *et al.* Algal esterase activity as a bioassay of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquatic Toxicology*, 2002, **59**(3-4): 209-223.
- [25] Myklestad S. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *The Science of the Total Environment*, 1995, **165**: 155-164.
- [26] De Philippis R, Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, **22**: 151-175.
- [27] De Philippis R, Sili C, Vincenzini M. Response of an exopolysaccharide -producing heterocystous cyanobacterium to changes in metabolic carbon flux. *Journal of Applied Phycology*, 1996, **8**: 275-281.
- [28] van Rijssel M, Janse I, Noordkamp DJB *et al.* An inventory of factors that effect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa*. *Journal of Sea Research*, 2000, **43**: 297-306.
- [29] Thornton DO. Diatom aggregation in the sea: mechanisms and ecological implications. *European Journal of Phycology*, 2002, **37**: 149-161.
- [30] Kohata K, Watanabe M. Diel changes in the composition of photosynthetic pigment and cellular carbon and nitrogen in *Chattonella Antigua* (Raphidophyceae). *Journal of Phycology*, 1988, **24**: 58-66.
- [31] Raven JA. The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Functional Ecology*, 1998, **12**: 503-513.
- [32] Smith REH, Kalf J. Size-dependent phosphorous uptake kinetics and cell quota in phytoplankton. *Journal of Phycology*, 1982, **18**: 275-284.
- [33] Turpin DH, Harrison PJ. Cell size manipulation in natural marine, planktonic, diatom communities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 1980, **37**: 1193-1195.
- [34] 王 进, 李建宏, 华秀红等. 吞噬微囊藻的鞭毛虫的培养. 湖泊科学, 2005, **17**(2): 183-187.
- [35] Tillmann U. Interactions between planktonic microalgae and protozoan grazers. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2004, **51**(2): 156-168.