

太湖微囊藻对几种枝角类种群影响的实验生物学分析*

张钰^{1,2}, 谷孝鸿^{1**}, 朱光敏³, 何俊^{1,2}

(1: 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

(2: 中国科学院研究生院, 北京 100049)

(3: 南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

摘要: 微囊藻是形成蓝藻水华最普遍的一种, 不同枝角类受微囊藻的影响不同. 实验从太湖梅梁湾分离天然的微囊藻, 研究了其对长刺溞、隆线溞、短尾秀体溞和角突网纹溞四种枝角类存活和生殖的影响. 在微囊藻食物浓度为 1×10^6 cells/ml, 测得四种枝角类的半致死时间 (LT_{50}) 分别为长刺溞 3.03 d、隆线溞 3.79 d、短尾秀体溞 8.48 d 和角突网纹溞 9.25 d, 体长较小的短尾秀体溞和角突网纹溞的半致死时间相对较长; 实验过程中没有观察到长刺溞和隆线溞有新生幼体, 而短尾秀体溞和角突网纹溞在少数几天里产出了少量新生幼体. 以不同浓度微囊藻 ($0.5 \times 10^6 - 8 \times 10^6$ cells/ml) 喂养枝角类, 测得四种枝角类的 24h 半致死浓度 (LC_{50}) 分别为: 4.10×10^6 、 4.78×10^6 、 6.21×10^6 和 7.77×10^6 cells/ml. 参照以栅藻喂养的枝角类生长情况, 可知太湖微囊藻对四种枝角类的存活和生殖有很强的负面作用, 其中体长较大的长刺溞和隆线溞受的影响相对较大.

关键词: 太湖; 微囊藻; 枝角类; 半致死时间; 半致死浓度

Experimental biological approach to the effects of *Microcystis* on some cladoceran population in Lake Taihu

ZHANG Yu^{1,2}, GU Xiaohong¹, ZHU Guangmin³ & HE Jun^{1,2}

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

(2: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P. R. China)

(3: Nanjing Forest University, Nanjing 210037, P. R. China)

Abstract: *Microcystis* is one of the most common and most studied bloom-forming cyanobacteria and a well-known producer of microcystins. Different cladocerans usually exhibited different responses to the toxicity of *Microcystis*. In the present study, the effects of toxic *Microcystis* from Lake Taihu were investigated by performing acute tests on cladocerans (*Daphnia longispina*, *Daphnia carinata*, *Diaphanosoma brachyurum* and *Ceriodaphnia cornuta*), using crude *Microcystis* extract. On a diet of *Microcystis* (1×10^6 cells/ml), the median lethal time (LT_{50}) of four cladocerans were 3.03, 3.79, 8.48 and 9.25 days, respectively. The longer LT_{50} were recorded for *D. brachyurum* and *C. cornuta* which have small size. Among the experiment, there was no new neonates of *D. longispina* and *D. carinata*, and few new neonates of *D. brachyurum* and *C. cornuta*. The 24h- LC_{50} of *D. longispina*, *D. carinata*, *D. brachyurum* and *C. cornuta* were 4.10×10^6 , 4.78×10^6 , 6.21×10^6 and 7.77×10^6 cells/ml. So, the effects of *Microcystis* on the survivorship and fecundity of cladoceran population in Lake Taihu were very intense, and the effects of *D. brachyurum* and *C. cornuta* which have small size were relatively gently.

Keywords: Lake Taihu; *Microcystis*; cladoceran; median lethal time; median lethal concentration

水体富营养化引发的蓝藻水华已是全球性的水环境问题^[1-2]. 微囊藻是形成蓝藻水华最普遍的一种,

* 江苏省自然科学基金项目资助 (BK2002148). 2006-10-23 收稿; 2007-01-23 收修改稿. 张钰, 男, 1983 年生, 硕士研究生; yuzhang@niglas.ac.cn.

** 通讯作者; E-mail: xhgu@niglas.ac.cn.

微囊藻水华的群体形式存在^[3]、低营养价值^[4]和产生毒素^[5]等特征决定其不适合做浮游动物食物. 不同枝角类受微囊藻的影响亦不同^[6]. 以往的研究主要集中在实验室培养的蓝藻品系对枝角类的影响^[7-9],而对于天然水体中微囊藻对枝角类的影响报导较少^[10]. 本文从太湖梅梁湾水体中分离天然的微囊藻,研究了其对太湖常见的四种枝角类存活和生殖的影响,得到了太湖微囊藻对四种枝角类的半致死时间和半致死浓度. 研究结果对了解太湖浮游生物食物网关系以及蓝藻水华对浮游动物群落的影响有重要意义.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用长刺溞(*Daphnia longispina*)、隆线溞(*Daphnia carinata*)、短尾秀体溞(*Diaphanosoma brachyurum*)和角突网纹溞(*Ceriodaphnia cornuta*)采于太湖梅梁湾口中国科学院太湖湖泊生态系统研究站(太湖站)采样栈桥,取同一母体的后代,在温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、光照 12L: 12D 的光照培养箱里用斜生栅列藻(*Scenedesmus obliquus*)配合面包酵母(baker's yeast)做饵料^[11]连续培养,获得实验用溞. 斜生栅列藻用 COMBO 培养基培养,培养条件同枝角类. 微囊藻亦取自太湖站采样栈桥,实验前用 25 号浮游生物网(63 μm)过滤湖水^[12]带到实验室,再用 250 μm 筛网过滤去除掉较大群体的微囊藻、大型浮游动物和杂质,把剩余的水样在 5000 转/min 速率下离心 10 min,将集中在上层的微囊藻移出^[10],置于冰箱中冷冻,再在室温下解冻,如此冷冻/解冻重复 3 次^[10],得到高浓度天然微囊藻(经镜检除极少量丝藻外均为铜绿微囊藻). 根据需要用过滤湖水(Whatman GF/C 滤膜过滤)稀释到预定的实验浓度^[13]. 实验于 2006 年 6-7 月在太湖站实验室进行.

1.2 实验方法

1.2.1 太湖微囊藻对枝角类的半致死时间(LT_{50})及繁殖率影响 用微囊藻作为食物喂养长刺溞、隆线溞、短尾秀体溞和角突网纹溞. 微囊藻食物浓度为 1×10^6 cells/ml(约为太湖梅梁湾夏季微囊藻平均浓度^[14]),食物组设三个重复,每个重复中移入 10 只新生枝角类幼体(<12h old),实验在 100 ml 烧杯中进行,每 24 h \pm 2 h 计数枝角类存活数和新生幼体,若有新生幼体则将其移出,把依然存活的枝角类移入到新鲜的相同浓度的微囊藻溶液中继续实验,直到最后一个枝角类死亡而停止实验^[10,15].^① 用斜生栅列藻喂养枝角类(食物浓度为 1×10^5 cells/ml)作为对照,亦设三个重复,每个重复移入 10 头新生枝角类幼体,实验在 250 ml 烧杯中进行,每 24 \pm 2 h 计数枝角类数量,培养基和藻每天更换,实验持续 10 d.

1.2.2 太湖微囊藻对枝角类的半致死浓度(LC_{50}) 设置 7 个微囊藻食物浓度喂养枝角类,分别为 $0, 0.5 \times 10^6, 1 \times 10^6, 2 \times 10^6, 4 \times 10^6, 6 \times 10^6, 8 \times 10^6$ cells/ml,每个食物组设三个重复,每个重复中移入 10 头新生枝角类幼体,实验在 100 ml 烧杯中进行,24 h 后计数各食物组中枝角类的死亡数.

1.3 计算方法

枝角类的存活率和繁殖率,用下列公式表示^[16-18]:

$$l_x = S_x / S_0 \quad (1)$$

$$m_x = N_x / S_x \quad (2)$$

其中, l_x 为枝角类的特定年龄存活率(Age specific survivorship, %)表示 x 年龄组开始时存活个体的百分数; S_x 为 x 年龄组存活的枝角类数目; S_0 为实验开始时枝角类的数目; m_x 为特定年龄繁殖率(Fecundity, ind./ind.)表示 x 年龄组平均每个个体产幼数; N_x 为 x 年龄组新生枝角类幼体的数目.

枝角类半致死时间和半致死浓度采用概率单位法计算,根据死亡百分数-概率单位换算表,将死亡百分数换算成死亡概率单位,浓度对数和概率单位间呈直线关系,以回归法求出 LT_{50} 和 LC_{50} ,置信区间按照 Litchfield-wilcoxon 法计算^[19].

以栅藻为食物时,枝角类的种群增长率用如下公式计算^①:

$$g = (\ln C_t - \ln C_0) / t \quad (3)$$

① 陈非洲. 丝藻和微囊藻对梅梁湾浮游甲壳动物的影响[博士后研究报告]. 南京: 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 2005.

其中, g 为枝角类种群增长率, C_t 和 C_0 为实验结束和开始时枝角类的数量, t 为实验持续时间.

2 结果

2.1 栅藻为食物条件下的枝角类种群增长率

以栅藻为食物时, 四种枝角类种群数量从第 3 d 或第 4 d 开始均呈快速增长趋势 (图 1), 用公式 (3) 计算得到长刺溞、隆线溞、短尾秀体溞和角突网纹溞 10 d 的平均种群增长率分别达到 0.46、0.44、0.29、0.28, 可见以栅藻为食物时, 四种枝角类的生长和繁殖均呈良好状态.

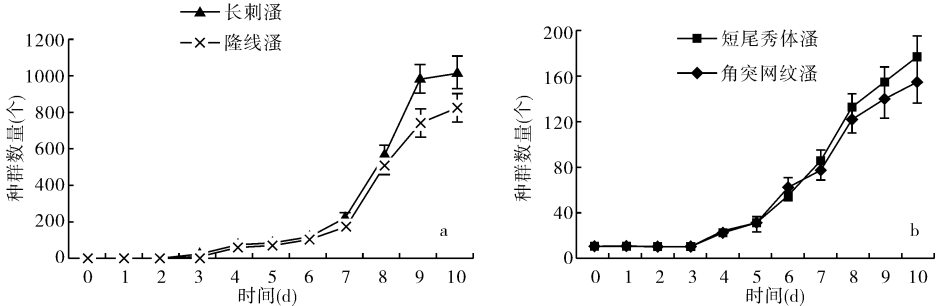


图 1 在栅藻食物条件下 (10^5 cells/ml) 长刺溞和隆线溞 (a) 以及短尾秀体溞和角突网纹溞 (b) 的种群数量
Fig. 1 Population quantity of *D. longispina*, *D. carinata* (a), *D. brachyurum*, *C. coruta* (b) on a diet of *Scenedesmus* (10^5 cells/ml)

2.2 微囊藻对枝角类种群的半致死时间及繁殖率影响

用公式 (1) 和 (2) 分别计算出在 1×10^6 cells/ml 微囊藻食物条件下四种枝角类的特定年龄存活率和特定年龄繁殖率 (图 2). 长刺溞、隆线溞、短尾秀体溞和角突网纹溞分别在第 6 d、第 8 d、第 15 d 和第 18 d 内全部死亡. 短尾秀体溞和角突网纹溞在前 5 d 内存活率急剧下降, 但在第 6 d 到第 13 d 里它们的存活率趋于稳定, 与长刺溞和隆线溞相比它们表现出了对微囊藻的一段适应期. 计算得出四种枝角类的半致死时间 (LT_{50}) (表 1), 长刺溞和隆线溞的半致死时间分别为 3.03 d 和 3.79 d, 相比较而言, 体长较小的短尾秀体溞和角突网纹溞则表现出相对较长的存活时间, 半致死时间分别为 8.48 d 和 9.25 d.

表 1 在 10^6 cells/ml 微囊藻食物浓度下
四种枝角类的半致死时间 (LT_{50}) *

Tab. 1 Median lethal time (LT_{50} , d) of the four cladoceran on a diet of *Microcystis* (10^6 cells/ml)

种类	LT_{50} (d)
长刺溞 (<i>D. longispina</i>)	3.03 (2.84 - 3.25)
隆线溞 (<i>D. carinata</i>)	3.79 (3.60 - 4.09)
短尾秀体溞 (<i>D. brachyurum</i>)	8.48 (8.48 - 9.48)
角突网纹溞 (<i>C. coruta</i>)	9.25 (8.56 - 10.23)

* 95% 置信区间.

表 2 微囊藻食物条件下四种枝角
类的半致死浓度 (LC_{50}) *

Tab. 2 Median lethal concentration of the four cladoceran population on a diet of *Microcystis*

种类	LC_{50} (10^6 cells/ml)
长刺溞 (<i>D. longispina</i>)	4.10 (3.84 - 4.24)
隆线溞 (<i>D. carinata</i>)	4.78 (3.60 - 4.96)
短尾秀体溞 (<i>D. brachyurum</i>)	6.21 (5.68 - 6.62)
角突网纹溞 (<i>C. coruta</i>)	7.77 (7.56 - 8.23)

* 95% 置信区间.

在实验期间长刺溞和隆线溞组别中均没有观察到新生幼体. 短尾秀体溞在第 8、9、10 等天里观察到有新生幼体, 特定年龄繁殖率分别为 3.0、4.0 和 3.0 等; 角突网纹溞在第 10、11、12 等天里观察到新生幼体, 特定年龄繁殖率分别为 3.0、5.0 和 2.0 等.

2.3 微囊藻对枝角类种群的半致死浓度

计算得到 7 种微囊藻食物浓度下四种枝角类 24 h 后的死亡率 (图 3). 可见微囊藻食物浓度越大枝角

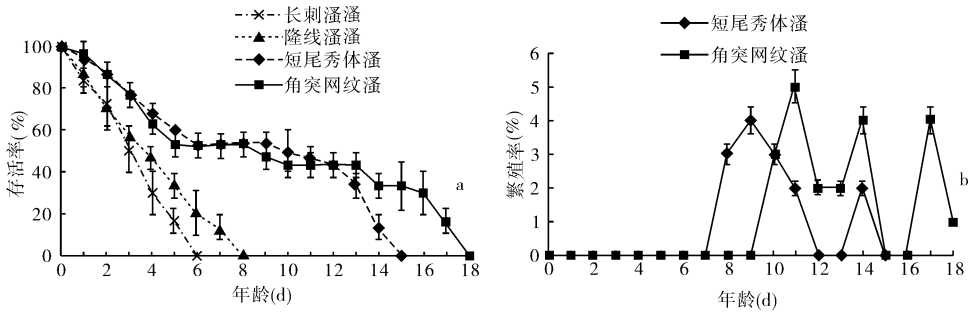


图2 在 10^6 cells/ml 微囊藻食物浓度下四种枝角类的存活率(a)和繁殖率(b)

Fig. 2 Survivorship(a) and fecundity(b) of the four cladoceran on a diet of *Microcystis* (10^6 cells/ml)

类的死亡率也越高. 在 8×10^6 cells/ml 微囊藻食物浓度下, 长刺溞、隆线溞、短尾秀体溞和角突网纹溞的死亡率分别为 100%、87%、68% 和 53%, 长刺溞和隆线溞的死亡率均比短尾秀体溞和角突网纹溞的高. 计算得出四种枝角类的半致死浓度 (LC_{50}) (表 2). 长刺溞和隆线溞的 LC_{50} 分别为 4.10×10^6 cells/ml 和 4.78×10^6 cells/ml, 短尾秀体溞和角突网纹溞的半致死浓度分别为 6.21×10^6 cells/ml 和 7.77×10^6 cells/ml. 与四种枝角类的半致死时间规律相似, 小型枝角类(短尾秀体溞和角突网纹溞)的半致死浓度比大型枝角类(长刺溞和隆线溞)的要高, 即大型枝角类对微囊藻的反应较小型枝角类敏感.

综合而言, 参照以栅藻为食物时四种枝角类均表现出良好状态, 可见微囊藻对四种枝角类的生长和繁殖有很强的负面影响.

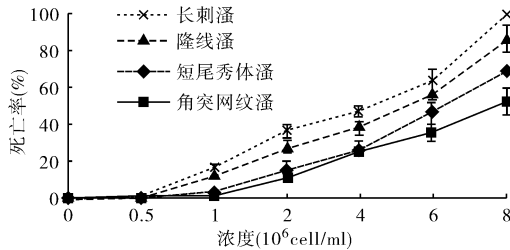


图3 不同微囊藻食物浓度下四种枝角类 24 h 后的死亡率

Fig. 3 Mortality rates of the four cladoceran after 24 h on a diet of *Microcystis* ($0.5 \times 10^6 - 8 \times 10^6$ cells/ml)

3 讨论

早在 1930 - 1940 年间就有关于蓝藻代谢物对人、畜和鱼危害的报道, 但随后的研究多集中在高等动物上, 而对于水生无脊椎的实验研究则很少^[20]. 本文选取了两种太湖梅梁湾春季优势种长刺溞和隆线溞, 两种夏季优势种短尾秀体溞和角突网纹溞作为实验动物, 并从太湖分离天然的微囊藻, 研究了微囊藻对四种枝角类存活和生殖的影响. 影响浮游动物对微囊藻适应能力的因素有很多, 但总体来说有以下两点.

3.1 蓝藻的种类

本文的结果显示太湖微囊藻对四种枝角类的存活和生殖有负面影响, 尤其是对较大型的枝角类影响更甚. 但是关于蓝藻尤其是微囊藻对浮游动物存活和繁殖的影响, 报道的结论不相一致. Lampert 提到 *Daphnia pulicaria* 在微囊藻条件下不再生长和繁殖^[21], 而 De Berardi 却说短钝溞 (*Daphnia obtusa*) 和透明溞 (*Daphnia hyaline*) 的存活和繁殖不受影响^[22]. 尝试关于蓝藻对浮游动物影响的观点达成一致相当困难^[22]. 有人就提到有些微囊藻产生毒素, 而有些却不产生. 所以浮游动物对蓝藻的适应能力一是取决于浮游动物的种类, 二是取决于蓝藻的种类^[13]. 一般来说铜绿微囊藻是有毒的, 而水华微囊藻则不表现毒性,

绿色微囊藻和惠氏微囊藻也有一定的毒性^[23]。许秋瑾提到太湖微囊藻毒素最高时可达 38050 ng/L^[24]。Stangenberg 发现新鲜未破碎的群体微囊藻对长刺溞的存活和生殖没有明显负面影响;当群体微囊藻被冷冻破碎后,对长刺溞的毒性作用就表现出来了^[25]。本文在获取天然微囊藻时亦采取了冷冻/解冻 3 次破坏微囊藻群体和释放其毒性的办法。

3.2 浮游动物的种类

本文的实验结果显示体长较小的短尾秀体溞和角突网纹溞在微囊藻食物条件下存活时间相对较长,半致死浓度也相对较高,且能表现出一定的繁殖力;而体长较大的长刺溞和隆线溞受微囊藻的影响则较大。一些研究也表明体长较大的枝角类受有毒微囊藻的影响更大,而小型枝角类由于壳瓣狭窄受群体微囊藻的影响较小^[26]。Nandini 提出了一个体肠比(体长:肠道长)的概念,这比单独用体长来衡量枝角类受微囊藻的影响大小更具说服力,例如老年低额溞(*Simocephalus vrtulus*)的体肠比比较大,较短的肠道通过时间使它受微囊藻毒害的作用较小^[27]。DeMott 研究表明不同浮游动物具有的蛋白质磷酸酶(protein phosphatase)活性水平不同,蚤状溞(*Daphnia pulex*)的蛋白质磷酸酶活性水平较 *Daphnia pulicaria* 的低,则实验表明 *D. pulex* 对微囊藻毒素(Microcystin-LR)的敏感性较 *D. pulicaria* 低^[28]。另外 Lampert 在实验中得到所有的枝角类在有微囊藻条件下,滤水率都降低,而网纹溞和象鼻溞的滤水率降低的最少,这可能是这两种常常在自然水体中与微囊藻水华共存的原因。也有报道提到与蓝藻水华共存的浮游动物种类可能是其对毒素的遗传抵抗性(genetic resistance)增强的表现,且随着微囊藻的壮大,枝角类也从大型向小型演变^[21],这和太湖实际情况相一致。

本文实验结果表明太湖微囊藻对四种枝角类的存活率和繁殖率有负面影响,且浮游动物对蓝藻的利用效率极低,浮游动物对蓝藻摄食乏力^[13],所以单独用浮游动物控制水华是不太现实的^[29]。

致谢:感谢陈非洲老师在浮游动物种类鉴定方面给予的大力帮助;另外太湖站钱荣树工程师、刘伟龙博士、赵巧华博士、王芳硕士以及南京信息工程大学孟芳硕士等均对本文有贡献,在此一并感谢。

4 参考文献

- [1] Parel H W, Fulton R S & Moisaner P H *et al.* Harmful freshwater algae blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *The Scientific World Journal*, 2001, **1**: 76 – 113.
- [2] Havens K E, James R T & East T L. N:P ratios, light limitation and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environmental Pollution*, 2003, **122**: 379 – 390.
- [3] DeMott W R, Gulati R D & Van Donk E. *Daphnia* food limitation in three eutrophic Dutch lakes: evidence for exclusion of large-bodied species by interfering filaments of cyanobacteria. *Limnology and Oceanography*, 2001, **46**: 2054 – 2060.
- [4] Kilham S S, Kreeger D A & Goulden C E. Effects of algal food quality on fecundity and population growth rates of *Daphnia*. *Freshwater Biology*, 1997, **38**: 639 – 647.
- [5] Sivonen K, Niemelä S I. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia*, 1990, **190**: 267 – 275.
- [6] Jungmann D. Toxic compounds isolated from *Microcystis* PCC7806 that are more active against *Daphnia* than two microcystins. *Limnology and Oceanography*, 1992, **37**: 1777 – 1783.
- [7] Ferrão-Filho A S, Fileto C & Lopes N P. Effects of essential fatty acids and N and P-limited algae on the growth rate of tropical cladocerans. *Freshwater Biology*, 2003, **48**: 759 – 767.
- [8] Lürling M. Effects of microcystin-free and microcystin-containing strains of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* on growth of the grazer *Daphnia magna*. *Environment and Toxicology*, 2003, **18**: 202 – 210.
- [9] Gustafsson S, Hansson L A. Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquatic Ecology*, 2004, **38**: 37 – 44.
- [10] Sotero-Santos R B, Silva C R. Toxicity of a cyanobacterium bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tietê River, São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, **64**: 163 – 170.

- [11] 王 岩,李 轩.不同食物组合与投喂方法对蒙古裸腹溠生长和生殖的影响.水产学报,2004,**28**(3):343-346.
- [12] 陈宇炜,高锡云,陈伟民等.太湖微囊藻的生长特征及其分离纯培养的初步研究.湖泊科学,1999,**11**(4):351-356.
- [13] Nandini S. Responses of rotifers and cladocerans to *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae): a demographic study. *Aquatic Ecology*,2000,**34**:227-242.
- [14] 李 军,刘丛强,肖化云等.太湖北部夏季浮游藻类多样性与水质评价.生态环境,2006,**15**(3):453-456.
- [15] Guo Nichun, Xie Ping. Development of tolerance against toxic *Microcystis aeruginosa* in three cladocerans and the ecological implications. *Environmental Pollution*,2006,**64**:163-170.
- [16] Sarma S S S, Nandini S. Life table demography and population growth of *Brachionus variabilis* Hempel, 1896 in relation to *Chlorella vulgaris* densities. *Hydrobiologia*,2001,**446/447**:75-83.
- [17] 马 蕊,牛翠娟,鲍 蕾等.食物浓度对方形臂尾轮虫发育历期与实验种群增长参数的影响.动物学报,2004,**50**(5):753-758.
- [18] 陈 艳,王金秋,王 阳等.微囊藻毒素对褶皱臂尾轮虫的毒性效应和种群增长影响.中国环境科学,2002,**22**(3):198-201.
- [19] 周永欣,张宗涉.水生生物毒性试验方法.北京:农业出版社,1989.
- [20] Lampert W. Laboratory studies on zooplankton-cyanobacteria interaction. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*,1987,**21**:483-490.
- [21] Lampert W. Toxicity of the blue-green *Microcystis aeruginosa*: Effective defence mechanism against grazing pressure by *Daphnia*. *Verh Internat Verein Limnology*,1981,**21**:1436-1440.
- [22] De Bernardi R, Giussani G. Are blue green algae a suitable food for zooplankton? An overview. *Hydrobiologia*,1990,**200/201**:29-41.
- [23] 何家苑,何振荣,郭琼林.有毒铜绿微囊藻对鱼和溠的毒性.湖泊科学,1997,**9**(1):49-56.
- [24] 许秋瑾.太湖藻类生长模拟及微囊藻毒素的研究[学位论文].南京:中国科学院南京地理与湖泊研究所,2002:35-36.
- [25] Stangeberg M. Toxic effects of *Microcystis aeruginosa* Kg. Extracts on *Daphnia longispina* O. F. Müller and *Eucypris virens* Jurine. *Hydrobiologia*,1968,**32**:81-87.
- [26] Thompson J M, Ferguson A J & Reynolds C S. Natural filtration rates of zooplankton in a closed system: the derivation of a community grazing index. *Journal of Plankton Research*,1982,**4**:545-560.
- [27] Nandini S & Rao T R. Somatic and population growth in selected cladoceran and rotifer species offered the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as food. *Aquatic Ecology*,1998,**31**:283-298.
- [28] De Mott R W, Dhawale S. Inhibition from in-vitro protein phosphatase activity in three zooplankton species by microcystin-LR, a toxin from cyanobacteria. *Hydrobiologia*,1995,**134**:417-424.
- [29] Dawidowicz P. Effectiveness of phytoplankton control by large-bodied and small-bodied zooplankton. *Hydrobiologia*,1990,**200/201**:43-47.