

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00323

中国淡水水体常见束丝藻种类的形态及生理特性研究

吴忠兴¹ 曾波¹ 李仁辉² 宋立荣²

(1. 西南大学生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要:束丝藻(*Aphanizomenon* Morr. ex Born. et Flah)是我国水华蓝藻的重要种类, 由其产生的束丝藻水华已经引起了许多的环境问题。水华束丝藻、柔细束丝藻和依沙束丝藻是我国淡水水体常见的三种束丝藻种类, 然而, 国内外对它们的生理学研究却相对较少。基此, 文章对水华束丝藻、柔细束丝藻和依沙束丝藻的形态特性、色素含量、生长及光合作用进行了比较研究, 结果表明丝状体的营养细胞、异形胞和厚壁孢子的长宽比具有一定的差异性, 揭示了厚壁孢子的长宽比可作为三种束丝藻分类的一个参数; 同时, 种间的差异性也体现在三种束丝藻的生理特性上, 相比水华束丝藻和依沙束丝藻, 柔细束丝藻的藻蓝素含量较高, 而叶绿素 a 、类胡萝卜素含量、最大光合作用(P_m)、表观光合作用效率(α)和最大电子传递速率(ETR_{max})显著偏低。此外, 水华束丝藻和依沙束丝藻生理特性基本一致, 表明了形态不同的三种束丝藻在生理上可被分为两种类型, 暗示了依沙束丝藻可能具有像水华束丝藻一样形成水华的生理潜能且由于它的产毒性所以应该倍加关注。

关键词:束丝藻; 形态特性; 色素; 光合作用; 生理特性

中图分类号: Q949.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)02-0323-06

蓝藻水华的暴发, 造成湖泊水质恶化、透明度下降、厌氧程度提高、生物多样性下降和优势物种改变, 从而破坏了水体生态系统结构和功能, 对人类健康、生态安全造成巨大的破坏^[1]。束丝藻是一类我国水体常见的水华蓝藻, 束丝藻水华与微囊藻水华交替出现, 已构成了滇池独特的蓝藻水华现象^[2]。

目前, 国内外对微囊藻水华形成的原因已经进行广泛、深入的研究^[3], 然而, 对束丝藻的研究主要集中于束丝藻的分类和分子系统学上, 而对束丝藻水华形成机理的研究则相对较少。因此, 为了揭示束丝藻水华形成的机理, 有必要对其生理生态特性开展研究。先前我们报道了柔细束丝藻(*Aphanizomenon gracile*)、依沙束丝藻(*A. issatschenkoi*)的典型形态特征和分布情况, 发现了柔细束丝藻和依沙束丝藻已经成为我国淡水水体束丝藻的重要种类, 其数目有时可达 10^7 至 10^9 个细胞/L^[4]。此外, 也发现了水华束丝藻(*A. flos-aquae*)、柔细束丝藻和依沙束丝藻在分子系统学上的具有一定的差异^[5], 但这三种

束丝藻的生长、生理和生态特性仍未见报道。因此, 本文对这三种我国淡水水体常见的束丝藻种类的形态和生理特性进行了研究, 旨在了解三种束丝藻生理生态上的差异, 为揭示束丝藻水华形成生理学机制提供依据, 也为蓝藻水华的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 藻种分离、培养

在湖北、云南、广东、江西、安徽、江苏、上海、北京等地的水体, 用 25#浮游生物网捞取水体中的浮游藻类, 使用经典的毛细管法, 即用巴斯德吸管制作的毛细管(Pasteur Micropipette)在解剖镜下挑取单根藻丝, 清洗 6—8 次, 最后放入含有 5 mL CT 培养基中。在光强为 $25 \mu E/(m^2 \cdot s)$, 光暗周期为 12h: 12h, 温度为 $(25 \pm 1)^\circ C$ 条件下培养获得单种藻种。每种束丝藻分别对 322 个营养细胞、110 个异形胞和 63 个厚壁孢子 Olympus BL 51 进行观察、拍照, 用 Image-pro Express Iplite Application 5.1(Media

收稿日期: 2010-12-20; 修订日期: 2011-10-25

基金项目: 国家自然科学基金(30800123); 西南大学博士基金(SWU110065); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCXE-YW-E-0932)资助

通讯作者: 吴忠兴(1975—), 男, 教授; 主要从事藻类生理生态及分子系统学性研究。 E-mail: wuzhx@swu.edu.cn

Cybenetics, Inc. USA)工作站进行形态参数的处理统计。获得的每种束丝藻随机各选 3 株经扩大培养到对数期后, 进行生理实验, 各值为三株藻株的平均值。

1.2 类胡萝卜素(Carotenoids)、叶绿素含量(Chl. *a*)藻蓝素含量和比生长速率(μ)的测定

取 3 mL 藻样, 10000 r/min 转速离心 5min, 弃上清液, 暗处研磨后, 加入 3 mL 80%的丙酮, 低温暗处静置 24h 提取脂溶性色素。24h 后 10000 r/min 离心 5min, 取上清液分别测定 663 nm 和 450 nm 的光吸收值。根据 Richards, *et al.* [6] 的公式分别计算叶绿素和类胡萝卜素的含量。

藻蓝蛋白含量的测定方法参照 Abelson 和 simon 方法 [7], 分别测定 620 nm、650 nm 和 565 nm 下的光吸收值, 并计算藻蓝素的含量。类胡萝卜素和藻蓝素含量以单位叶绿素的相对含量表示。

比生长速率(μ)通过公式 $\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$ 进行计算 [8]。

1.3 光合放氧测定和 P-I 曲线 (Photosynthesis Irradiance Curve)测定

不同光强下的光合放氧通过 Clark 氧电极型光合放氧仪测定, 每次测定时间不少于 5min, 单位用每分钟单位干重的放氧量 [$\mu\text{mol O}_2/\text{g(DW)} \cdot \text{min}$] 表示。P-I 曲线通过公式 $P = P_m * \tanh(\alpha * I / P_m) + R_d$ [9] 进

行拟合、计算, 各参数的获得参考 Wu, *et al.* [10]。

1.4 光反应曲线(Light Response Curve)和电子传递速率

以浮游植物荧光分析仪(PHYTO-PAM, Waltz 公司, 德国)检测微囊藻的光合系统 II (PS II) 在饱和脉冲光强下叶绿素荧光值的变化, 计算出 PS II 的有效量子产率(Effective Quantum Yields)和电子传递速率(Electron Transfer Rate, ETR), 电子传递速率计算参考 Wu, *et al.* [10]。

1.5 数据处理

所有实验设 3 个平行, 拟合曲线用软件 Origin 6.0 进行拟合和绘图。

2 结果

2.1 我国淡水水体常见的束丝藻种类形态特征

我国淡水水体常见的束丝藻根据其形态分为三类, 即水华束丝藻 (*Aphanizomenon flos-aquae*)、柔细束丝藻 (*A. gracile*) 和依沙束丝藻 (*A. issatschenkoi*)。水华束丝藻藻丝常聚集成束状, 末端细胞延伸成柱状或圆形, 细胞成透明状; 柔细束丝藻常单藻丝存在, 末端细胞并不延伸和形成透明状细胞; 依沙束丝藻与上述两种束丝藻最明显的区别就是末端细胞明显延伸形成如发丝状的细胞(图 1)。

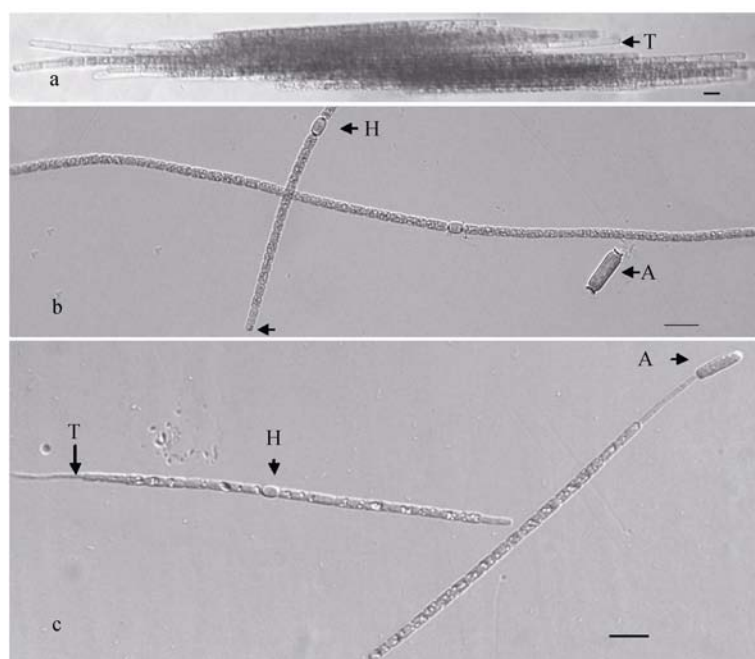


图 1 三种束丝藻丝状体形态特征图

Fig. 1 Morphology of the trichomes in three *Aphanizomenon* types

a. 水华束丝藻; b. 柔细束丝藻; c. 依沙束丝藻; A. 厚壁孢子; H. 异形胞; T. 末端细胞. 比例为 10 μm
a. *Aphanizomenon flos-aquae*; b. *A. gracile*; c. *A. issatschenkoi*; A. Akinete; H. heterocyst; T. terminal cell. Bar. 10 μm

对藻丝体进行统计发现, 三种束丝藻的不同细胞的长宽比具有一定的差异。水华束丝藻的营养细胞长宽比分布较分散; 柔细束丝藻长宽比主要集中在 1.0—2.0; 而依沙束丝藻长宽比主要集中于 1.0—2.5(图 2A)。水华束丝藻的异形胞长宽比分布也较分散; 柔细束丝藻长宽比则主要集中在大于 2.0 范围; 依沙束丝藻则主要集中于 1.7—2.0(图 2B)。三者的厚壁孢子长宽比分布显著不同, 水华束丝藻主要集中于 2.0—3.0 范围; 柔细束丝藻主要分布在大于 2.5 范围; 依沙束丝藻则主要分布在小于 2.5 范围(图 2C)。

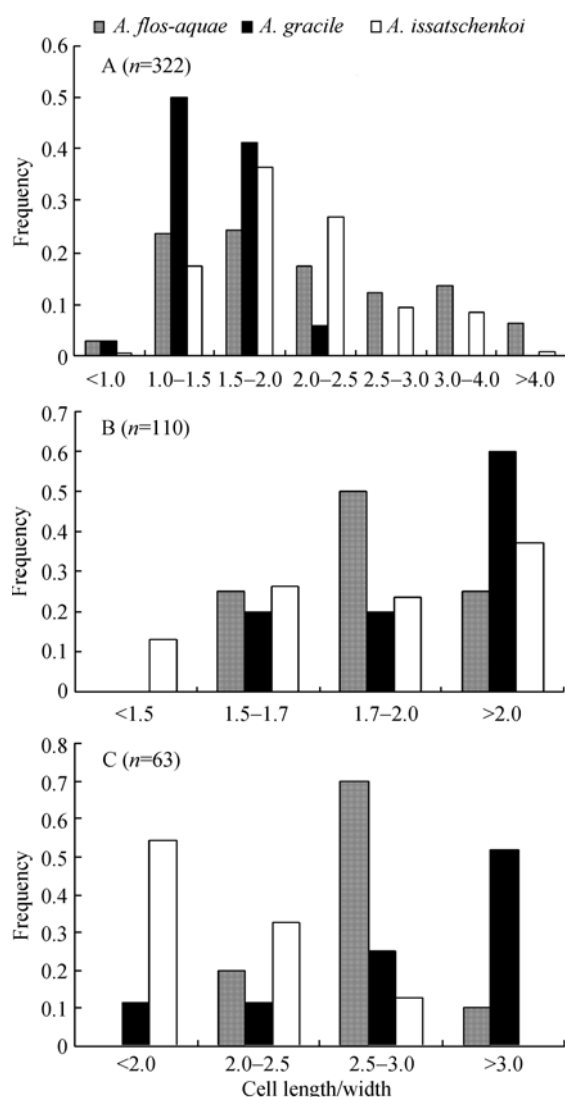


图2 三种束丝藻不同细胞的长宽比分布

Fig. 2 The frequency distributions for length/width ratios of different cells in three *Aphanizomenon* types

A. 营养细胞; B. 异形胞; C. 厚壁孢子; n. 表示细胞数

A. Vegetative cell; B. Heterocyst; C. Akinete; n. cell number

2.2 三种常见束丝藻的色素含量、生长特性

不同种类的束丝藻随机各选取 3 株对其色素含量和生长特性比较研究, 结果表明水华束丝藻和依沙束丝藻的叶绿素 *a* 含量、藻蓝素和类胡萝卜素相对含量均未呈现出明显的差异(图 3A-C)。然而, 柔细束丝藻的叶绿素 *a* 含量和类胡萝卜素相对含量均显著低于其他两种束丝藻($P < 0.05$, ANOVA)(图 3A、B), 藻蓝素相对含量明显高于其他两种束丝藻($P < 0.05$, ANOVA)(图 3C)。

三种束丝藻的生长表现出一定的差异性, 水华束丝藻、柔细束丝藻和依沙束丝藻最大比生长速率(μ)分别为: (0.122 ± 0.006) 、 (0.094 ± 0.004) 和 $(0.119 \pm 0.002)/d$ (图 3D)。

2.3 三种常见束丝藻的光合特性

对三种束丝藻光合放氧进行测定, 结果表明(图 4), 水华束丝藻和依沙束丝藻的最大光合作用(P_m)、表观光合作用效率(α)高于柔细束丝藻。然而, 三种束丝藻的暗呼吸(R_d)、饱和光强(I_k)和光补偿点(I_c)均未表现出明显的差异(表 1)。

三种束丝藻的电子传递速率(ETR)表明, 柔细束丝藻的电子传递速率显著低于水华束丝藻和依沙束丝藻, 水华束丝藻、依沙束丝藻和柔细束丝藻最大电子传递速率(ETR_{max})分别为 (114.37 ± 4.25) 、 (97.4 ± 3.45) 和 $(32.27 \pm 0.49) \mu\text{mol electrons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 表现出显著的差异性 ($P < 0.05$, ANOVA)(图 5)。

3 讨论

研究对我国淡水水体三种常见的束丝藻种类的形态特征进行比较, 发现水华束丝藻、柔细束丝藻和依沙束丝藻除在顶端细胞上具有明显的区别外^[4], 通过统计表明营养细胞、异形胞和厚壁孢子的长宽比的分布频率也具有明显的不同(图 2), 特别是厚壁孢子的长宽比可以作为一个分类的重要参数。

三种束丝藻的色素含量呈现出不同的特征, 柔细束丝藻的叶绿素 *a*、类胡萝卜素等色素含量明显低于水华束丝藻和依沙束丝藻, 而藻蓝素则较高; 水华束丝藻和依沙束丝藻色素含量则基本相同。然而, 三种束丝藻的比生长速率却并没有呈现显著的差异, Gantt, *et al.*^[11]研究表明蓝藻不含绿藻及高等植物中具有叶绿素 *b*, 而是以藻蓝蛋白作为天线色素将吸收的光线能量传递给 PS II, 藻蓝蛋白含量的增加, 有助于提高藻细胞光合作用效率。这表明

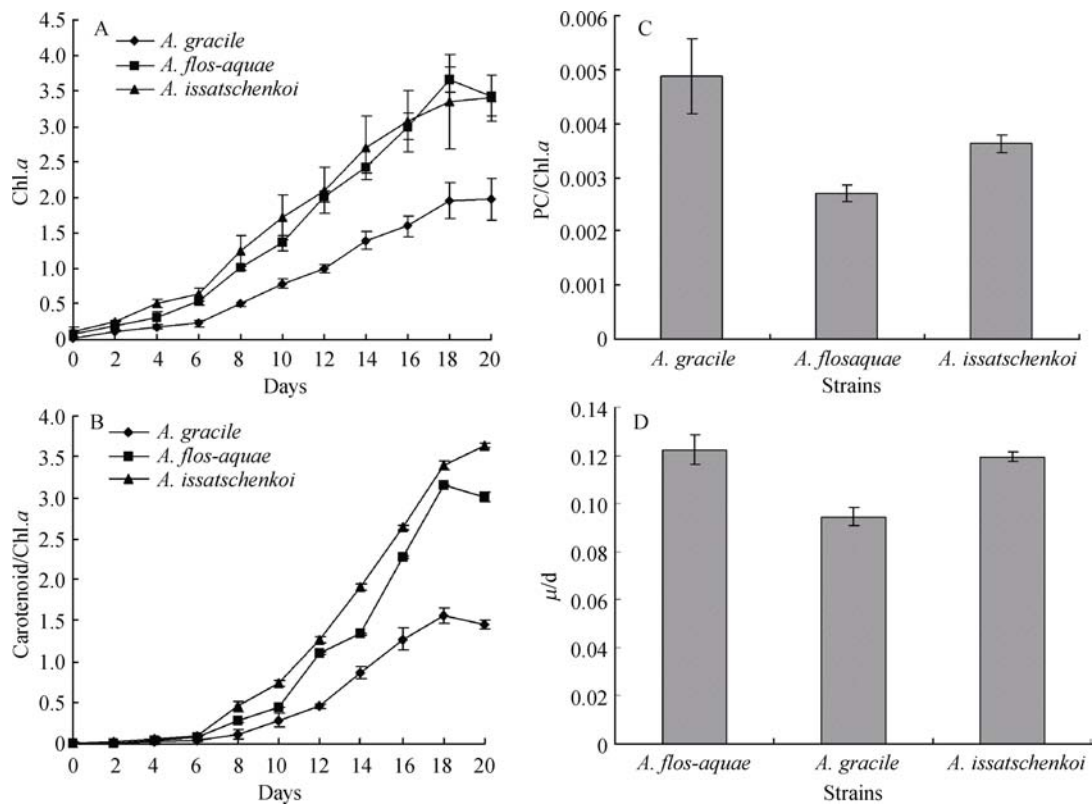


图 3 三种常见束丝藻的色素含量、生长变化

Fig. 3 The change of pigment contents and specific growth rates in three *Aphanizomenon* types

A. 叶绿素 *a*; B. 类胡萝卜素/叶绿素 *a*; C. 藻蓝素/叶绿素 *a*; D. 比生长速率
A. Chl. *a*; B. Carotenoid/ Chl. *a*; C. PC/ Chl. *a*; D. specific growth rate

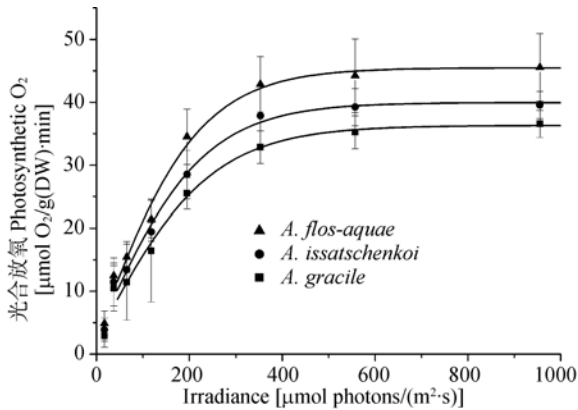


图 4 三种束丝藻的光合作用 P-I 曲线

Fig. 4 The curve of Photosynthetic O₂ evolution-irradiance for *Aphanizomenon flos-aquae*, *A. gracile*, and *A. issatschenkoi* strains

表 1 三种常见束丝藻的光合作用参数

Tab. 1 Parameters of photosynthesis-irradiance curves for *Aphanizomenon flos-aquae*, *A. gracile* and *A. issatschenkoi* strains

Strains	P_m [μ mol O ₂ /g(DW)·min]	α [μ mol O ₂ /g(DW)·min]	R_d [μmol O ₂ /g(DW)·min]	I_k [μmol photons/(m ² ·s)]	I_c [μmol photons/(m ² ·s)]
<i>A. gracile</i>	34.50±4.27	0.16±0.06	-3.15±0.21	215.62±14.30	19.68±0.66
<i>A. flos-aquae</i>	44.71±4.08	0.21±0.05	-3.17±0.41	212.90±15.94	15.10±2.76
<i>A. issatschenkoi</i>	39.85±4.17	0.19±0.06	-3.09±0.74	209.73±32.77	16.26±6.54

了柔细束丝藻可能通过藻蓝素来弥补叶绿素 *a* 和类胡萝卜素含量的不足, 使其获得光合作用需要的光能。但由于光能的限制, 导致了柔细束丝藻比生长速率有一定的降低。

P-I 曲线的形状和大小反应了光合作用调节的基本生理、生物化学和代谢过程 [12, 13]。本研究对三种束丝藻的 P-I 曲线进行了测定, 结果表明了柔细束丝藻具有较低的最大光合作用(P_m)和表观光合作用效率, 表明了柔细束丝藻的光合作用低于水华束丝藻和依沙束丝藻, 这可能与藻蓝素捕获光能的能力有关。柔细束丝藻的较低光合作用也表现在其光合系统 II 的电子传递速率上。ETR 是 PS II 有效的光化

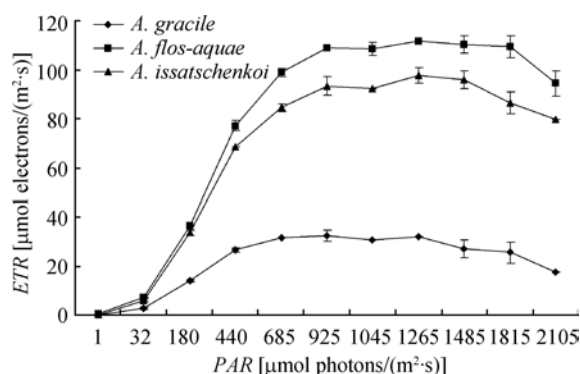


图 5 三种束丝藻的电子传递速率曲线

Fig. 5 The electron transport rates (ETR) of *Aphanizomenon flos-aquae*, *A. gracile*, and *A. issatschenkoi* strains at log phase

学产率的产物^[14], 其反映了光合生物光合作用活性的大小, 在一定程度上决定了植物的生长速率^[15, 16]。柔细束丝藻较低的 ETR_{max} 也进一步表明了其光合色素的不同对其光合作用能力的影响。

依沙束丝藻从光合色素含量、比生长速率和光合参数上都与水华束丝藻没有明显的差异, 这暗示了依沙束丝藻可能具有像水华束丝藻一样形成水华的能力。然而, 依沙束丝藻已被报道是产神经毒素 (PST) 的种类^[17], 这将可能对水体生态安全造成严重危害, 因此必须给予关注。

参考文献:

- [1] Carmichael W W. Health Effects of Toxin Producing Cyanobacteria: "The Cyano HABs" [J]. *Human and Ecological Risk Assessment*, 2001, 7(5): 1393—1407
- [2] Liu Y M, Liu Y D, Li D H, *et al.* Bioassay for the toxicity of *Aphanizomenon flos-aquae* bloom from Lake Dianchi [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(2): 216—218 [刘永梅, 刘永定, 李敦海, 等. 滇池束丝藻水华毒性生物检测. 水生生物学报, 2004, 28(2): 216—218]
- [3] Kong F X, Gao G. Hypothesis on cyanobacteria bloom-forming mechanism in large shallow eutrophic lakes [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(3): 589—595 [孔繁翔, 高光. 大型浅水富营养化湖泊中蓝藻水华形成机理的思考. 生态学报, 2005, 25(3): 589—595]
- [4] Wu Z X, Yu G L, Shi J Q, *et al.* The two newly recorded species of bloom-forming cyanobacterial genus *Aphanizomenon* Morr. ex Born. et Flah. (Cyanophyta) from China [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(6): 1140—1144 [吴忠兴, 虞功亮, 施军琼, 等. 我国淡水水华蓝藻—束丝藻 (*Aphanizomenon* Morr. ex Born. et Flah.) 新记录种. 水生生物学报, 2009, 33(6): 1140—1144]
- [5] Wu Z X, Shi J Q, Lin S, *et al.* Unraveling molecular diversity and phylogeny of *Aphanizomenon* (Nostocales, Cyanobacteria) strains isolated from China [J]. *Journal of Phycology*, 2010, 46(5): 1048—1058
- [6] Richards F A, Thompson T G. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. II. A spectrophotometer method for the estimation of plankton pigments [J]. *Journal of Marine Research*, 1952, 11(2): 156—172
- [7] Abelson J N, Simon M I. Phycobiliproteins in cyanobacteria. In: Lester P, Alexander N G (Eds.), *Method in Enzymology* [M]. New York: Academic Press Inc. 1988, 318—328
- [8] Guillard R RL. Division rates. In: Stein J R (Eds.), *Handbook of Phycological Methods* [M]. Cambridge University Press, Cambridge. 1973, 289—311
- [9] Qiu B S, Gao K S. Effects of CO₂ enrichment on the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae): physiological responses and relationships with the availability of dissolved inorganic carbon [J]. *Journal of Phycology*, 2002, 38(4): 721—759
- [10] Wu Z X, Gan N Q, Huang Q, *et al.* Response of *Microcystis* to copper stress—Do phenotypes of *Microcystis* make a difference in stress tolerance [J]. *Environmental Pollution*, 2007, 147(2): 324—330
- [11] Gantt E. Phycobilisomes [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1981, 32(1): 327—347
- [12] Falkowski P G. Molecular ecology of phytoplankton photosynthesis. In: Falkowski P G, Woodhead A D (Eds.), *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea* [M]. Plenum Press, New York. 1992, 47—67
- [13] Falkowski P G, Raven J A. The physics and physiology of photosynthesis in aquatic ecosystems [J]. *Journal of Phycology*, 1997, 33(6): 1085—1086
- [14] Masojidek J. Physiological and molecular responses of algae to extreme conditions [J]. *Nova Hedwigia*, 2001, 123(4): 499—500
- [15] Demmig B, Winter K, Kruger A, *et al.* Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in nerium oleander exposed to a combination of high light and water stress [J]. *Plant Physiology*, 1988, 87(1): 17—24
- [16] Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Schulze E D, Caldwell W W (Eds.), *Ecophysiology of Photosynthesis* [M]. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg. 1995, 49—70
- [17] Wood S A, Rasmussen J P, Holland P T, *et al.* First report of the cyanotoxin anatoxin-a from *Aphanizomenon issatschenkoi* (cyanobacteria) [J]. *Journal of Phycology*, 2007, 43(2): 356—365

MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND COMMON *APHANIZOMENON* TYPES IN CHINESE WATER BODIES

WU Zhong-Xing¹, ZENG Bo¹, LI Ren-Hui² and SONG Li-Rong²

(1. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources Research in Three Gorges Reservoir Region, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: *Aphanizomenon* has been widely reported in many freshwater bodies, and was regarded as one of important bloom-forming cyanobacterial strains. Owing to its effect, directly or indirectly, to animals and human beings, great attention has been focused on the formation mechanism by researchers in areas such as, aquatic ecology, phycology, environmental science, and so on. In China, *Aphanizomenon* bloom has resulted in many environmental and ecological problems. As already illustrated, bloom-forming cyanobacteria has developed some sound ecological strategies to form water bloom with a series of special physiological mechanisms and adaptation characters during evolution. However, the physiological mechanisms and adaptation characters in *Aphanizomenon* remain largely unknown. Previous study in our laboratory had shown that three types of *Aphanizomenon*, *A. flos-aquae*, *A. gracile* and *A. issatschenkoi*, were the most common strains in Chinese freshwater bodies. Due to the limitation of samples and knowledge, however, the physiological characters were not compared in the three-type strains so far. Therefore, in order to further explore their knowledge and investigate the bloom-forming mechanism in *Aphanizomenon*, in the present study, their morphological and physiological characteristics, including the ratio of length and width in vegetative cell, heterocyst and akinete, growth rate, pigment composition, photosynthetic O₂ evolution, and the electron transport rate (*ETR*), were compared in *A. flos-aquae*, *A. gracile* and *A. issatschenkoi*. The results indicated that some morphological differences were found in the frequency distributions for length/width ratios of vegetative cells, heterocyst, and akinetes. Among them, the most significant difference was found in the akinetes, suggesting that the length/width ratios of akinetes could be regarded as a taxonomic unit in the genus *Aphanizomenon*. Moreover, physiological differences were also showed in three types of *Aphanizomenon*. Compared with the strains of *A. flos-aquae* and *A. issatschenkoi*, the strains of *A. gracile* displayed higher PC contents. However, the strains of *A. gracile* showed significantly lower chlorophyll *a*, carotenoid contents, maximum photosynthesis (*P_m*), apparent photosynthetic efficiency (*α*), and maximal electron transport rates (*ETR_{max}*) in comparison with the other strains of *Aphanizomenon*. It suggested that the strain of *A. gracile* showed lower competitive abilities in photosynthesis when compared with the strains of *A. flos-aquae* and *A. issatschenkoi*. In addition, similar physiological features, such as the value of *P_m* and *ETR_{max}*, pigment contents and specific growth rate (*μ*), were found in *A. flos-aquae* and *A. issatschenkoi*. These data suggested that the three morphological strains of *Aphanizomenon* could be divided into two types based on their physiological characterizations, namely, *A. gracile*-type and *A. flos-aquae/issatschenkoi*-type, and indicated that the strains of *A. issatschenkoi* might be potential bloom-formation strains as the same as the strains of *A. flos-aquae* and must be played a considerate attention due to its toxicity.

Key words: *Aphanizomenon*; Morphological characteristic; Pigment; Photosynthesis; Physiological characteristic