

有毒和无毒微囊藻对大型溞生长和繁殖的影响

李效宇 张志娟 李磊

(河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007)

EFFECTS OF MICROCYSTIS ON THE GROWTH AND REPRODUCTION OF DAPHNIA MAGNA

LIXiao-Yu, ZHANG Zhi-Juan and LI Lei

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007)

关键词: 微囊藻; 大型溞; 毒性; 生长; 繁殖

Key words: *Microcystis*; *Daphnia magna*; Toxicity; Growth; Reproduction

中图分类号: Q178.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)06-1198-04

近年来,随着工农业的快速发展和人们生活水平提高,一些城市生活污水和工农业废水流入江河、湖泊等淡水水体中,加剧了水体的富营养化和污染,导致蓝藻过度生长繁殖而形成水华,其中最常见的是微囊藻水华^[1,2]。微囊藻水华消落腐烂时会发出难闻的气味,严重影响水体的利用价值,更为严重的是多数微囊藻有毒,能产生毒素并引起鱼类、家禽、牲畜等中毒或死亡。同时,有毒微囊藻水华还对人类健康造成威胁,如引发肝炎、促发肝癌^[3-5]。因此,由微囊藻水华引起的水体二次污染问题已引起国内外有关研究者的普遍关注。我国是受蓝藻水华影响最大的国家之一,2007年5月江苏太湖蓝藻水华大暴发,引发无锡市居民饮用水危机。另外,发生蓝藻水华的水体,生物多样性明显下降,微囊藻能严重排斥其他水生生物的生存。

枝角类是水体浮游动物的重要类群,而且它们能够摄食微囊藻,研究它们和微囊藻的生态关系非常必要。其中大型溞是国际通用的毒理学实验标准模式动物,其生长繁殖速度快且易于培养,对环境条件变化敏感性高。在水生生物生态毒理试验研究方面,国内外不少学者应用大型溞进行慢性毒性试验。如 Gorbi G 和 Corradi M G Dave G 研究了有关金属、农药、有机毒物对大型溞的存活、生长、生殖的影响^[6,7],修瑞琴、庄德辉关于大型溞生长、生殖、种群增长研究^[8,9]等。但对于微囊藻与大型溞的实验生态学研究报道很少,近年来在国内外仅见少量研究,如刘河川等^[10]报道了有毒微囊藻对大型溞生长和生存影响的初步研究结果;Guo N 和 Xie P^[11]、Jang

M H, *et al.*^[12]研究了大型溞与微囊藻及其毒素的生态学关系;另外,Mohammed Z A^[13]还报道了微囊藻毒素在大型溞体内的生物富集作用等。关于有毒或无毒微囊藻对大型溞的生长发育的影响以及慢性毒性方面的系统研究尚无报道。本文研究了不同密度有毒和无毒微囊藻对大型溞的生长和繁殖的影响并探讨二者之间的种群生态关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料 有毒铜绿微囊藻 DS (*Microcystis aeruginosa* DS)和无毒铜绿微囊藻 573 (*M. aeruginosa* 573)由中国科学院水生生物研究所藻种库提供。二者为铜绿微囊藻种的两个不同株系,基本生物学特性一致,但前者能产生毒素,而后者无毒。由于在藻种库的长期培养,目前两个株都为单细胞状态培养物。微囊藻都用 MA 培养基^[14]在光照培养箱中扩大培养,控制温度 25℃,表面光照 2000 lx,光暗比 16:8,静置培养。

大型溞 (*Daphnia magna*) 采自新乡东郊卫河,实验室内进行纯化培养并进行实验前的驯化,温度 21℃,表面光照 2000 lx,光暗比 16:8。试验中使用同一母体繁殖三代以上的出生 6—24h 的幼龄期大型溞作为实验对象,实验按 OECD 标准^[15]进行。

用单细胞藻类小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 喂养大型溞,喂食密度为 5×10^5 个细胞/mL。小球藻用 BG-11 培养基^[16]在光照培养箱中培养,温度 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$,表面光照 2000 lx,光

收稿日期: 2008-03-27; 修订日期: 2008-12-01

基金项目: 河南省科技创新杰出青年计划 (094100510012); 河南省高校杰出科研人才创新工程项目 (2006KYCX021); 教育部留学回国人员科研启动基金 [2006]331; 河南省水产养殖重点学科资助

通讯作者: 李效宇 (1965 -), 男, 河南新蔡县人; 教授; 主要从事蓝藻生物学研究。E-mail: lixiaoyu65@263.net

暗比 16 8。在指数生长期,将小球藻离心收集、4 保存。喂食前用双蒸水稀释到合适的浓度,小球藻的密度用血球计数板计数。因为本实验在大型溞的驯化过程中一直使用小球藻作为食物,同时考虑到在自然水体中小球藻也是大型溞的适口易消化天然食物,因此本实验使用小球藻作为对照。

1.2 试验方法

1.2.1 微囊藻对大型溞摄食率和滤水率的影响试验 先在 500 mL 盛有曝气自来水的烧杯中放入 30 只幼龄大型溞驯养,之后在 3 个 50 mL 的小烧杯中分别加入 DS 藻细胞液、573 藻细胞液及小球藻细胞液,使密度达到 5.0×10^5 细胞/mL,每个小烧杯放置 6—24h 的幼溞 10 个,计数藻的密度,黑暗下放置 5h,再计数藻的密度,计算不同试验液下的摄食情况。分别计算滤水率(F)和摄食率(I)。

$$F = V(\ln C_0 - \ln C_t) / (nt) \quad I = F(C_0 C_t)^{1/2}$$

式中 F ($\mu\text{L}/\text{个} \cdot \text{h}$) 为滤水率, I ($\text{细胞}/\text{个} \cdot \text{h}$) 摄食率, V (μL) 容积体积, n 大型溞个数, C_0 ($\text{细胞}/\text{mL}$) 藻液初始密度, C_t 藻液最终密度, t (h) 时间。

1.2.2 大型溞生长发育、繁殖与存活试验 取 70 只出生 6—24h 的健康幼溞,放入 1000 mL 内置曝气自来水的烧杯中,停食 1d 后,分别放入 50 mL 的小烧杯中,每个烧杯盛 20 mL 试验液,置 1 个溞。试验共分 7 个组,包括 6 个处理组和一个对照组(0)(表 1),每组 10 个平行。各组细胞密度为 5.0×10^5 细胞/mL,小球藻作对照,喂养 21d,每天记录大型溞死亡数、怀第一胎时间、怀卵数、产第一胎时间、产幼数,同时弃掉新产出的幼溞,21d 试验结束后测存活的大型溞体长。另外,每天记录大型溞死亡数,以检测微囊藻对大型溞存活的影响。

表 1 试验组组成表

Tab. 1 the component of the testing groups			
组号 Group s	小球藻	573	DS
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>M. aeruginosa</i>	<i>M. aeruginosa</i>
	(%)	573 (%)	DS (%)
0	100	0	0
1	0	100	0
2	0	80	20
3	0	60	40
4	0	40	60
5	0	20	80
6	0	0	100

1.3 统计学分析 实验数据采用 SPSS 11.5 和 Microsoft Excel 软件进行单因素方差分析和处理,分析结果用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。显著性差异通过 P 值表示,即 $^* P < 0.05$ 和 $^{**} P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 微囊藻对大型溞摄食率和滤水率的影响

大型溞对有毒微囊藻的摄食率 1.48×10^4 细胞/ $\text{h} \cdot \text{个}$,滤水率是 $220 \mu\text{L}/\text{h} \cdot \text{个}$ 。对无毒微囊藻的摄食率 $2.01 \times$

10^5 细胞/ $\text{h} \cdot \text{个}$,滤水率是 $290 \mu\text{L}/\text{h} \cdot \text{个}$ 。大型溞对小球藻的摄食率 2.52×10^5 细胞/ $\text{h} \cdot \text{个}$,滤水率是 $330 \mu\text{L}/\text{h} \cdot \text{个}$ 。由此可见,大型溞对有毒微囊藻的滤水率和摄食率低于对照组和无毒微囊藻组,且对有毒微囊藻、无毒微囊藻及小球藻三者的滤水率、摄食率呈逐渐递减的趋势,但三者的滤食率无显著差异(表 2),而大型溞对有毒微囊藻的摄食率与大型溞对小球藻即对照组的摄食率相比有极显著性差异(表 2)。

表 2 微囊藻对大型溞摄食率和滤水率的影响

Tab. 2 The filter and ingestion rates of <i>D. magna</i> in the different testing groups			
	小球藻 <i>C. vulgaris</i>	573 <i>M. aeruginosa</i> 573	DS <i>M. aeruginosa</i> DS
摄食率	2.52×10^5	2.01×10^5	$1.48 \times 10^4^{**}$
Ingestion rates (细胞/ $\text{h} \cdot \text{个}$)	(1.07×10^4)	(8.63×10^3)	(8.79×10^3)
滤水率	330	290	220
Filter rates ($\mu\text{L}/\text{h} \cdot \text{个}$)	(120)	(100)	(130)

注:表中括号内为标准差
Note: The values within the parentheses are the standard deviation

2.2 微囊藻对大型溞生长的影响

用不同密度有毒和无毒微囊藻喂养大型溞幼体 21d,试验结束后不同处理组与对照组的体长进行比较,结果如图 1。用微囊藻喂养没有小球藻组(对照)生长快,各处理组生长速度与对照组相比都有显著性差异($P < 0.05$),其中第 6 组和第 5 组与对照组体长相比有极显著性差异($P < 0.01$)。随着有毒微囊藻细胞密度的增加,大型溞的体长逐渐减小。

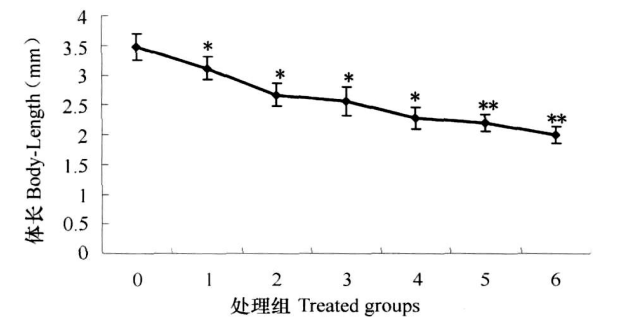


图 1 微囊藻对大型溞生长的影响

Fig. 1 The body-length of *D. magna* in the different testing groups

2.3 微囊藻对大型溞繁殖的影响

由图 2 可见,各处理组与对照组的繁殖量相比都有极显著性差异($P < 0.01$),第 6 组与第 1 组比较也有极显著性差异($P < 0.01$),100% 无毒微囊藻 573(第 1 组)的繁殖量与对照组及其他各组也有极显著性差异($P < 0.01$),2、3、4、5 组与对照组及第 1 组的繁殖量也存在极显著性差异($P < 0.01$),随着有毒微囊藻细胞密度的增加,繁殖量逐渐呈下降趋势。

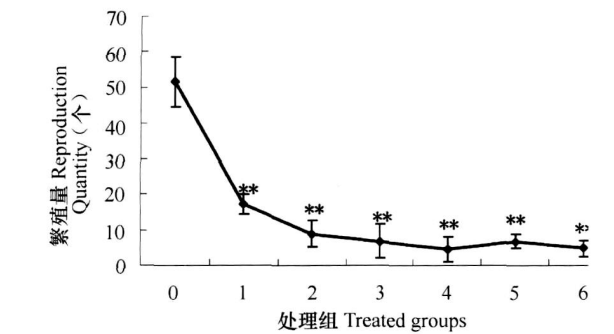


图 2 微囊藻对大型溞繁殖量的影响

Fig. 2 The reproduction quantity of *D. magna* in the different testing groups

从表 3 可以看出,试验溞自第 9 天起,对照组开始产幼溞,第 1 组从第 11 天开始,第 2 组从第 15 天产溞,第 3 组从第 14 天产溞,4、5、6 组都是第 17 天产溞。这说明细胞密度大的有毒微囊藻组产幼溞比较晚。

表 3 微囊藻对大型溞产幼的影响

Tab. 3 Effects of <i>M. microcystis</i> on the reproduction of <i>D. magna</i>							
处理时间	各试验组大型溞产幼数 (个)						
Treated time (d)	The young number of <i>D. magna</i> in the different testing groups						
	0	1	2	3	4	5	6
8	0	0	0	0	0	0	0
9	13	0	0	0	0	0	0
10	15	0	0	0	0	0	0
11	14	5	0	0	0	0	0
12	15	4	0	0	0	0	0
13	14	0	0	0	0	0	0
14	17	4	0	3	0	0	0
15	13	5	4	0	0	0	0
16	12	0	3	2	0	0	0
17	13	4	4	3	2	2	2
18	13	5	3	4	0	2	2
19	18	0	6	9	5	6	5
20	15	4	5	5	4	3	2
21	14	10	8	6	4	6	3

2.4 微囊藻对大型溞存活的影响

用 100% 有毒微囊藻细胞 (第 6 组) 喂养大型溞时,存活率为 60%,明显低于对照组及 573 组 (第 1 组),并且有毒微囊藻细胞密度越大,大型溞存活率越低,逐渐呈递减趋势 (表 4)。

表 4 微囊藻对大型溞存活率的影响

Tab. 4 Effects of <i>M. microcystis</i> on the survival rate of <i>D. magna</i>							
	0	1	2	3	4	5	6
存活率	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	80 ± 22.0	80 ± 23.0	100 ± 0.0	60 ± 45.0**
Survival rates							

3 讨论

3.1 微囊藻对大型溞生长的抑制作用

用不同密度有毒和无毒微囊藻细胞喂养大型溞,大型溞的体长随着有毒微囊藻细胞密度的增加而下降,说明有毒微囊藻抑制大型溞的生长。抑制生长的原因,一方面可能是微囊藻不易为大型溞消化吸收,同时微囊藻细胞内所含的毒素可能也会对大型溞生理代谢产生负面作用。Hanazato T, *et al.*^[17] 的研究表明,微囊藻经过细菌和原动物等的降解后可以作为大型溞的食物,而且能维持其正常的生长繁殖和发育。Jarvis A C, *et al.*^[18] 认为微囊藻不是枝角类的适口食物,因为微囊藻群体太大、营养价值低,而且毒素对枝角类有损伤作用。本试验所用微囊藻都是单细胞的,排除了群体过大不能为大型溞摄食的可能性。因此,作者认为,微囊藻不易被大型溞所消化吸收、微囊藻毒素对大型溞消化生理等方面的干扰是微囊藻抑制其生长的主要因素。

3.2 微囊藻对大型溞发育和繁殖的影响

实验中还发现,大型溞怀第一胎时间、产第一胎时间都随着有毒微囊藻细胞密度的增加而逐渐延长。大型溞的存活率和产幼数也随着有毒微囊藻细胞密度的增加而下降,但第 5 组却略有上升,推测可能是试验过程中的误差所致。用有毒微囊藻饲喂大型溞,延迟或阻碍了大型溞的怀卵和发育,导致大型溞死亡率升高。无毒微囊藻虽不影响大型溞的生存,但也延迟其怀卵时间并降低产幼数。因此,水体不同密度的有毒微囊藻细胞对枝角类的影响是不同的,有毒微囊藻细胞密度越大对大型溞生长繁殖和存活的不利影响就越大,这一结果与刘河川等^[10]、Guo N 和 Xie P^[11] 的研究报道一致。

3.3 微囊藻与大型溞的生态学关系

微囊藻是水体浮游植物中的重要类群,尤其是在富营养化水体中成为主要的初级生产者。大型溞作为水体的初级消费者能够摄食和消化微囊藻细胞,二者存在密切的食物关系。从本实验结果看,有毒微囊藻的毒性对大型溞的生长、繁殖等有一定的不良影响,而毒性的大小与有毒微囊藻细胞的密度呈正相关。无毒微囊藻对大型溞的生长影响不大,但也可影响其滤食率、消化率、怀卵量和繁殖量。所以,无论是用有毒还是无毒的微囊藻饲喂大型溞,都可能会严重影响大型溞的种群数量变化,减小其生物量。DeMott W R, *et al.*^[19,20] 在他们的实验研究中也有相似的结果。根据本实验结果,我们认为,大型溞虽然能够摄食消化有毒和无毒微囊藻,但营养吸收不好,并且有毒微囊藻细胞内的毒素对大型溞生长和繁殖有较强的毒性影响,从而抑制大型溞的生长并干扰其繁殖,使生殖率下降。

参考文献:

[1] de Figueiredo D R, Azeiteiro U M, Esteves S M, *et al.* Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue [J]. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 2004, **59**: 151—163

- [2] Hallegraeff G M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase [J]. *Phycologia*, 1993, **32** (2): 79—99
- [3] Falconer I R. Effects on human health of some cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes, and rivers [J]. *Toxicity Assessment*, 1989, **4**: 175—184
- [4] Codd G A, Morrison L F, Metcalf J S. Cyanobacterial toxins risk management for health protection [J]. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, **203** (3): 264—272
- [5] Li X Y, Song L R, Liu Y D. The production, detection and toxicology of microcystins [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23** (5): 517—523 [李效宇, 宋立荣, 刘永定. 微囊藻毒素的产生、检测和毒理学研究. 水生生物学报, 1999, **23** (5): 517—523]
- [6] Gorbi G and Corradi M G. Chromium toxicity on two linked trophic levels [J]. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 1993, **25**: 64—71
- [7] Dave G. Effects of fluoride on growth reproduction and survival in *Daphnia magna* [J]. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1984, **78** (2C): 425—431
- [8] Zhuang D H, Liang Y L, Deng G Q. Chronic toxicity of high mercury chloride to the *Daphnia magna* [J]. *Hydrobiology Collected Papers*, 1984, **18** (4): 449—456 [庄德辉, 梁彦龄, 邓冠强. 氯化高汞对大型溞的慢性毒性. 水生生物学集刊, 1984, **18** (4): 449—456]
- [9] Xiu R Q. The applied research of *Daphnia magna* in environmental sanitation [J]. *Hygienic Research*, 1985, **14** (4): 19—22 [修瑞琴. 大型溞在环境卫生上的应用研究. 卫生研究, 1985, **14** (4): 19—22]
- [10] Liu H C, Zhang W, Yu G Z, et al. The inhibition effects of *Microcystis aeruginosa* on the growth and reproduction of zooplankton [J]. *J. Xinyang Nor. Uni.* (Nat. Sci. Ed.), 2004, **17** (4): 437—439 [刘河川, 张伟, 余国忠, 等. 铜绿微囊藻对浮游动物生长繁殖的影响. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2004, **17** (4): 437—439]
- [11] Guo N, Xie P. Development of tolerance against toxic *Microcystis aeruginosa* in three cladocerans and the ecological implication [J]. *Environ. Polluti.*, 2006, **143**: 513—518
- [12] Jang M H, Ha K, Takamura N. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to different stages of herbivorous zooplankton [J]. *Toxicon*, 2008, **51**: 882—889
- [13] Mohamed Z A. Accumulation of cyanobacterial hepatotoxins by *Daphnia* in some Egyptian irrigation canals [J]. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 2001, **50**: 4—8
- [14] Ichimura T. Media for blue-green algae [M]. In: Nishizawa K, Chihara M (Eds.). *Methods in algological studies*. Tokyo: Kyoritsu, 1979, 294—305
- [15] OECD. Guidelines for testing of chemicals. *Daphnia* sp. acute immobilization test and reproduction test. OECD, Paris, France, 1984, 202, 1—16
- [16] Stainer R Y, Kunisawa R, Mandel M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) [J]. *Bacteriol. Rev.*, 1971, **35**: 171
- [17] Hanazato T, Yasuno M. Evaluation of *Microcystis* as food for zooplankton in a eutrophic lake [J]. *Hydrobiologia*, 1987, **144**: 251—259
- [18] Jarvis A C. Zooplankton community grazing in a hypertrophic lake (Hartbeespoort Dam, South Africa) [J]. *J. Plankton Res.*, 1986, **8**: 1065—1078
- [19] DeMott W R, Zhang Q X, Camichael W W. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia* [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 1991, **36** (7): 1346—1357
- [20] Nizan S, Dimentman C, Shilo M. Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna* [J]. *Limnol. Oceanogr.*, 1986, **31**: 497—502