

群体细胞间空隙在微囊藻水华形成过程中的浮力调节作用

张永生¹, 李海英^{2,3}, 孔繁翔^{1*}, 于洋¹, 张民¹

(1. 中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008; 2. 国家水电可持续发展研究中心, 北京 100038; 3. 中国水利水电科学研究院, 北京 100038)

摘要: 伪空胞一直被认为是蓝藻水华形成过程中的主要浮力提供者, 但是否是唯一的浮力提供者还不清楚. 本研究利用室内蓝藻水华形成模拟实验和野外实验相结合的方法, 从生理生态学角度探讨细胞间空隙对蓝藻水华形成的影响. 室内蓝藻水华形成模拟实验表明, 蓝藻在上浮过程中以单细胞形态存在, 但在水柱培养器取样口 6 开始形成小群体; 通过对细胞镇重物(胞外多糖、细胞干重和蛋白质等)的含量的分析表明, 胞外多糖在蓝藻上浮过程中, 变化率最大, 含量在水柱培养器取样口 6 处达到最大值, 在 3 次实验过程中, 胞外多糖的量分别为: 3.02、10.38 和 15.73 pg/cell. 野外蓝藻群体显示群体内部具有大量的细胞间空隙; 将野外蓝藻群体分别经 1.0 MPa 压力和超声波破碎仪 40 Hz 处理 1min, 结果发现蓝藻在 1.0 MPa 压力下, 群体内部不存在细胞间空隙, 并且伪空胞破裂, 蓝藻不能上浮, 但在超声波处理下, 蓝藻群体被打散成单细胞悬浮在水体中, 但伪空胞是完好无损. 实验结果表明, 蓝藻利用胞外多糖将蓝藻单细胞聚集成群体, 形成细胞间空隙, 细胞间空隙产生的浮力是蓝藻水华形成的主要因素之一.

关键词: 蓝藻; 细胞间空隙; 浮力调节; 水华形成; 浮力提供因子

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)06-1602-06

Role of Conony Intercellular Space in the Cyanobacteria Bloom-Forming

ZHANG Yong-sheng¹, LI Hai-ying^{2,3}, KONG Fan-xiang¹, YU Yang¹, ZHANG Min¹

(1. State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. National Research Center for Hydropower Sustainable Development, Beijing 100038; 3. China Institute of Water Resources and Hydropower Research, Beijing 100038, China)

Abstract: Gas vesicle is considered a major factor providing buoyancy for cyanobacteria ascending. However, whether other buoyancy contributing factors exist is still unclear. In this study, we combined indoor bloom simulation and field experiments to explore the impact of intercellular spaces on algal bloom formation. Indoor bloom simulation studies indicated that cyanobacteria exist as single cells when floating, but form small colonies at port 6. Cell ballast analysis [exopolysaccharide (EPS), cellular dry weight, protein, etc.] showed that EPS exhibits the most rapid change rate and the maximum level of cyanobacteria rises at port 6, which were 3.02, 10.38 and 15.73 pg/cell in three tests respectively. Field algae investigation revealed abundant intercellular spaces within algal colonies. When the field colonies were treated with 1.0 MPa pressure and ultrasonic processor at 40 Hz for 1 min, respectively, intercellular spaces disappeared and gas vesicles collapsed under 1.0 MPa pressure, causing increasing cyanobacteria failure. Under sonication, algal colonies were broken down into single cells that became suspended in water, but gas vesicles remained intact. These results suggested that single algal cells aggregate into colonies through EPS and form intercellular spaces to provide buoyancy, which is one of the major factors for bloom formation.

Key words: cyanobacteria; intercellular spaces; buoyancy regulation; bloom-forming; buoyancy contributing factors

蓝藻细胞利用伪空胞调节自身浮力进行垂直迁移, 以获取适宜的光能, 得到充足的营养盐, 致使它们在与其它藻类竞争时具有明显的优势^[1,2]. 孔繁翔等^[3]认为蓝藻水华形成之前, 蓝藻的生物量在水体中已经大量暴发, 蓝藻从悬浮水体到形成水华过程中, 伪空胞是否是浮力的主要提供者? 是否还存在其他的浮力提供因子? 诸多问题并不清楚.

由于因伪空胞破裂而导致浮力丧失迅速, 而且浮力恢复所需的伪空胞合成过程较慢 (> 24 h)^[4],

细胞增殖对伪空胞的稀释作用也需要以细胞的世代时间来度量, 因此蓝藻水华过程中不可能仅有伪空胞一种浮力提供因子. 但是迄今为止, 没有文献报道蓝藻其它浮力提供因子.

蓝藻外面由很多层结构所包被, 其主要成分被

收稿日期: 2010-06-22; 修订日期: 2010-08-26

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2008CB418000)

作者简介: 张永生(1977~), 男, 博士, 主要研究方向为湖泊生态学、环境生物学, E-mail: yszsunny@163.com

* 通讯联系人, E-mail: f.kong@niglas.ac.cn

称为细胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)^[5],通常以2种形式存在,其一为荚膜(capsule)或称胶鞘(sheath),其二为黏液层(slime).荚膜为一较薄的均一层,具均匀纤丝状结构,围绕在细胞壁外.黏液层是一非均匀厚层,包围在荚膜外^[5,6].而胞外多糖中荚膜和黏液层具有黏滞性^[6],可以将蓝藻单细胞黏着成群体,从而在群体内部形成细胞间空隙^[6,7](图

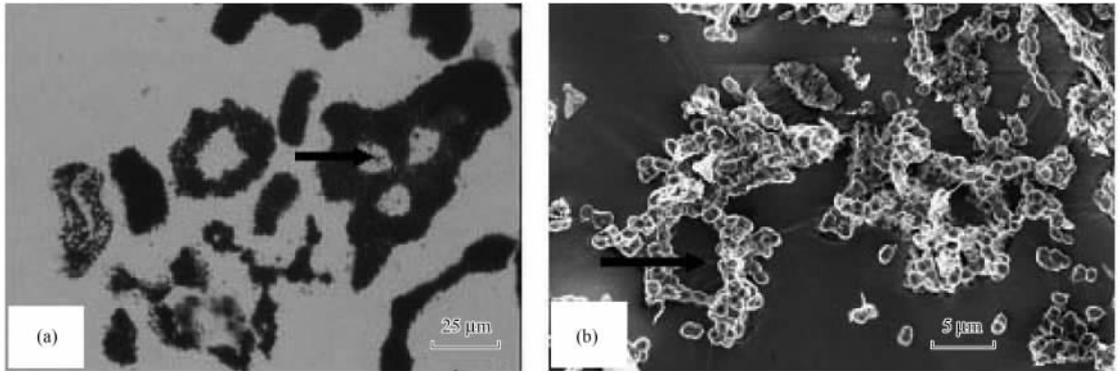


图1 蓝藻群体中的细胞间空隙(箭头所示)

Fig.1 Intercellular space (arrow) in aggregates of cyanobacteria

由于中国的淡水湖泊大多数属于浅水湖泊,且极易受到风浪的搅动,分层所取水样不能真实地反映整个静止水体中蓝藻垂直分布状况,因此不能准确地研究蓝藻水华形成机制,更不能确定蓝藻水华形成不同阶段为其提供浮力的主要因子,因此本研究利用室内蓝藻水华形成模拟实验和野外实验相结合的方法,从生理生态学角度探讨细胞间空隙对蓝藻水华形成的影响,并结合室内水柱模拟实验的数据,试图阐述细胞间空隙形成的原因,以期对探究蓝藻水华形成机制,为蓝藻水华暴发的治理提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 藻种的培养

微囊藻 FACHB930 由中科院淡水藻种库提供.将该藻种培养在 BG11 中(100 mg NaNO_3 、10 mg K_2HPO_4 、75 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、40 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、20 mg Na_2CO_3 、6 mg 柠檬酸铁和 1 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 L 去离子水),置于 500 mL 的三角瓶(200 mL 培养基)培养,温度为 28°C ,光照度为 2 500 lx,光暗比为 12 h:12 h,培养基的初始 pH 值为 8,接种量为 $2 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$.

1.2 蓝藻复苏模拟实验

待藻种生长进入指数期后,将藻种从水柱培养

器),这种结构不仅可以保护细胞不受不良环境的影响,而且还可能为蓝藻群体提供浮力,从而调节蓝藻细胞的运动,同时蓝藻利用荚膜和黏液层形成群体后扩大了在水体中的体积,增加了群体在水中受到的浮力.因此蓝藻群体细胞间空隙可能是蓝藻水华形成的重要浮力提供者之一.但目前这方面的研究尚属空白.

器的下端注藻口注入.水柱培养器的外面用不透光的锡箔纸包被(图2).将该装置置于温度为 28°C ,光照度为 2 500 lx,光暗比为 12 h:12 h 的培养室内.样品静置以防止培养液垂直搅动,藻种培养 30 d,按取样口 6~1 的顺序在各取样口各取样 5 mL,所取样品用同体积的 BG11 培养液由注藻口处小心注入,每 10 d 测相关指标一次.

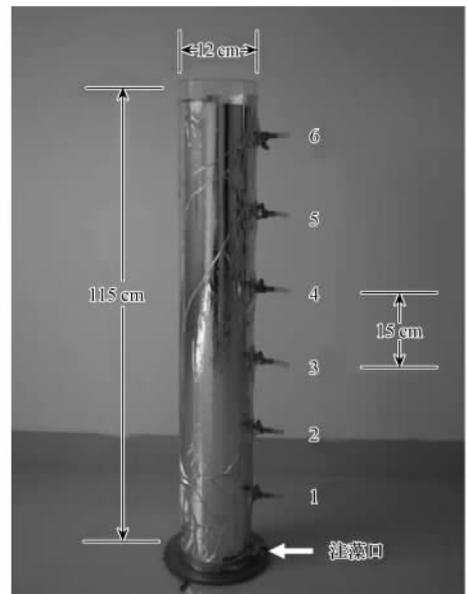


图2 藻细胞培养器

Fig.2 Culture cell reactor for cyanobacteria

1.3 检测指标

蓝藻数目:细胞流式仪计数;胞外多糖含量:采用蒽酮-硫酸法^[8];蛋白质含量:考马斯蓝染料结合法^[9];细胞干重检测:参照 Chi 等^[10]的方法.

1.4 微囊藻伪空胞的分离、纯化

伪空胞分离和纯化参考 Weathers 等^[11]的方法,略有改动:藻细胞培养至对数生长期,在培养基中加入 Mg^{2+} 和青霉素 G,使之最终浓度分别为 1 mmol/L 和 $250 \mu L^{-1}$,静置培养 6 h,用 300 r/min 离心法收集微囊藻细胞至装有 1 mol/L 甘油的试管中,轻摇试管 10 min,使蓝藻细胞和甘油充分混合.用 3 倍体积 0.02 mol/L、pH 7.7 Tris-Cl 进行渗透冲击,使细胞裂解,4℃ 冰箱放置 4 h,裂解液以 300 r/min 离心过夜,收集液面的淡蓝绿色层,收集液通过不同孔径 (1.2、0.8、0.65、0.45 μm) 的 GF/C 滤膜进行过滤,所得滤液在 2×30 cm 的 Sepharose 4B 柱上进行凝胶过滤,随后用 0.01 mol/L、pH 7.5 Tris-Cl 溶液洗脱,得乳白色洗脱液,以 300 r/min 离心 6 h,收集液面白色漂浮层(伪空胞的提取液)于 Eppendorf 管 4℃ 冰箱保存,用于电镜观察.

1.5 伪空胞的电镜观察

将 200 目铜网覆盖在伪空胞提取液上,静置吸附 15 min 后,用滤纸吸去多余液体,在铜网上滴 0.5 mL 的 2% 醋酸双氧铀溶液,避光染色 10 min,去掉染色液,样品自然干燥,在 H600 透射电子显微镜 (Hitachi, 日本) 下观察,负染色电镜观察试验在南京医科大学完成.

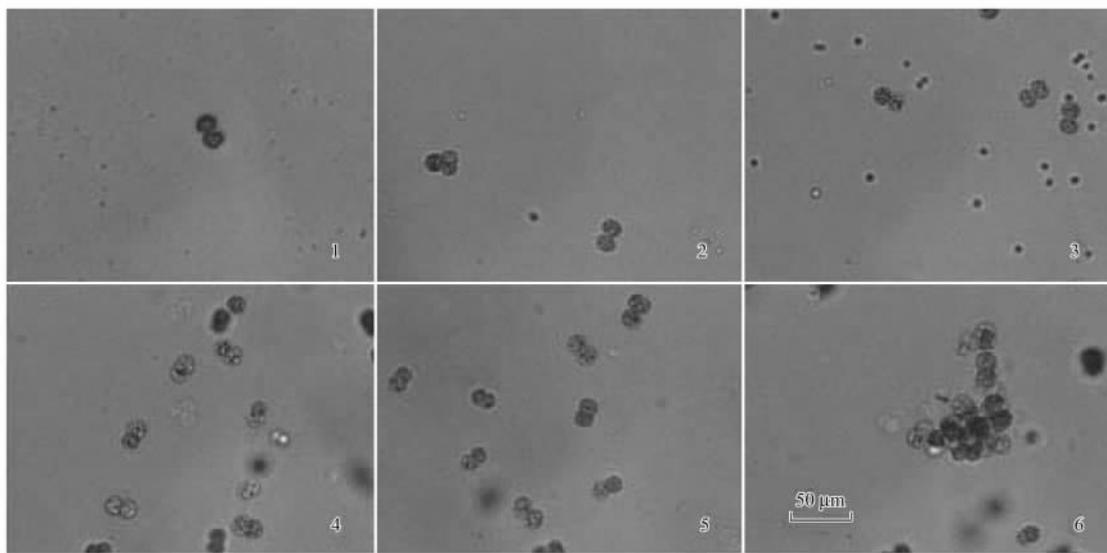
1.6 野外蓝藻水华样品处理

野外蓝藻水华于 2009 年 10 月,在太湖梅梁湾处采集.样品 1 无任何处理,做对照;样品 2 在 1.0 MPa 压强下处理;样品 3 超声波破碎仪 40 Hz 处理 1 min(确保蓝藻群体被打散成单细胞且单细胞不破碎).

2 结果与分析

2.1 蓝藻的形态及浓度

微囊藻 FACHB930 在水柱培养器中培养 30 d,在取样口 1~5 处,大部分蓝藻呈单细胞状态,且处于细胞分裂期,蓝藻生物量随着蓝藻的上浮而增大,而取样口 6 处,显微镜检测到了蓝藻群体(图 3).



图中数字代表取样口,照片为显微镜照片

图 3 蓝藻培养 30 d 的形态

Fig. 3 Morphology of *Microcystis* sp. FACHB930 at each water outlet cultivated for 30 days

第 10 d 测得水柱培养器中的藻浓度变化趋势随着水的深度变浅,蓝藻浓度增加,在取样口 4~5 之间蓝藻浓度增长率最大,藻浓度在取样口 6 处最大,为 7.2×10^5 cell/mL,第 20 d 和第 30 d 的浓度测试结果显示,各取样口的藻浓度变化趋势是一致的,即在水出口 1~5 蓝藻浓度随着水的深度变浅而增加,藻浓度在取样口 5 处最大,分别为 15.43×10^5

cell/mL 和 19.27×10^5 cell/mL(图 4).但取样口 5~6 之间,蓝藻浓度有下降趋势,而未在液面发现蓝藻水华现象.

2.2 细胞镇重物的变化

在 3 次实验中,蓝藻胞外多糖含量变化趋势都是随着水的深度变浅含量增加,但增长速率有差异[图 5(a)].第 10 d 测得的胞外多糖由深到浅,增长

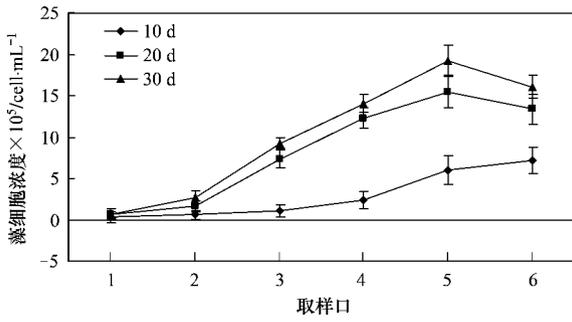


图4 水柱培养器取样口点的蓝藻浓度

Fig. 4 Cell concentration changes of *Microcystis* sp.

FACHB930 in three tests

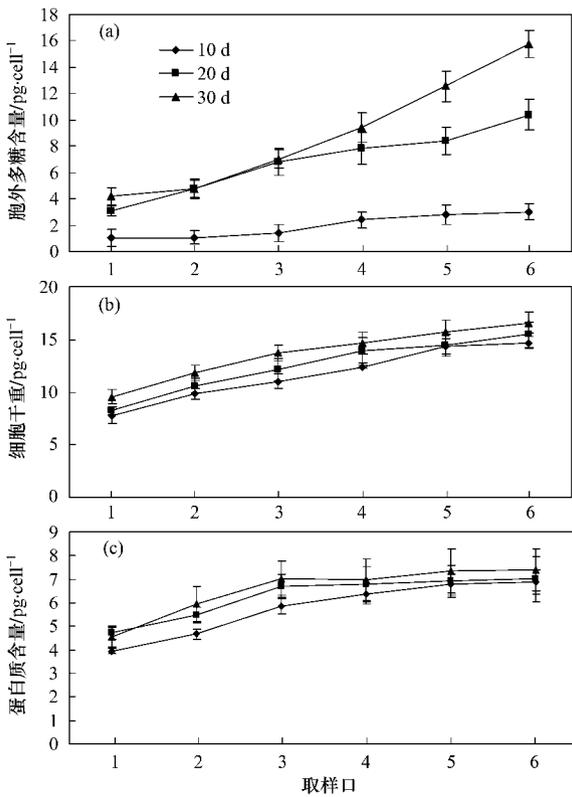


图5 水柱培养器各取样点的蓝藻细胞镇重物含量变化

Fig. 5 Changes in ballast in 6 water outlets

速度缓慢,取样口6处的胞外多糖的含量约是取样口1处含量的2.9倍,最大值在取样口6处,含量为3.02 pg/cell;而第20 d和第30 d随深度变浅胞外多糖含量增加迅速增加;最大值均出现在取样口6处,分别为:10.38 pg/cell和15.73 pg/cell,分别是取样口1处含量的3.2、3.9倍。

在3次检测结果表明,细胞干重在取样口6处分别是取样口1处的1.90、1.88、1.74倍,且各取样点的增加量变化缓慢[图5(b)]。

蓝藻细胞蛋白质含量变化趋势与细胞干重类似[图5(c)].蛋白质的在取样口6处的含量与在取样口1处的含量之差分别为2.95、2.29、2.85 pg/cell.蛋白质在取样口1至取样口3之间增长率较大,但取样口3到取样口6处的蛋白质含量的变化较小。

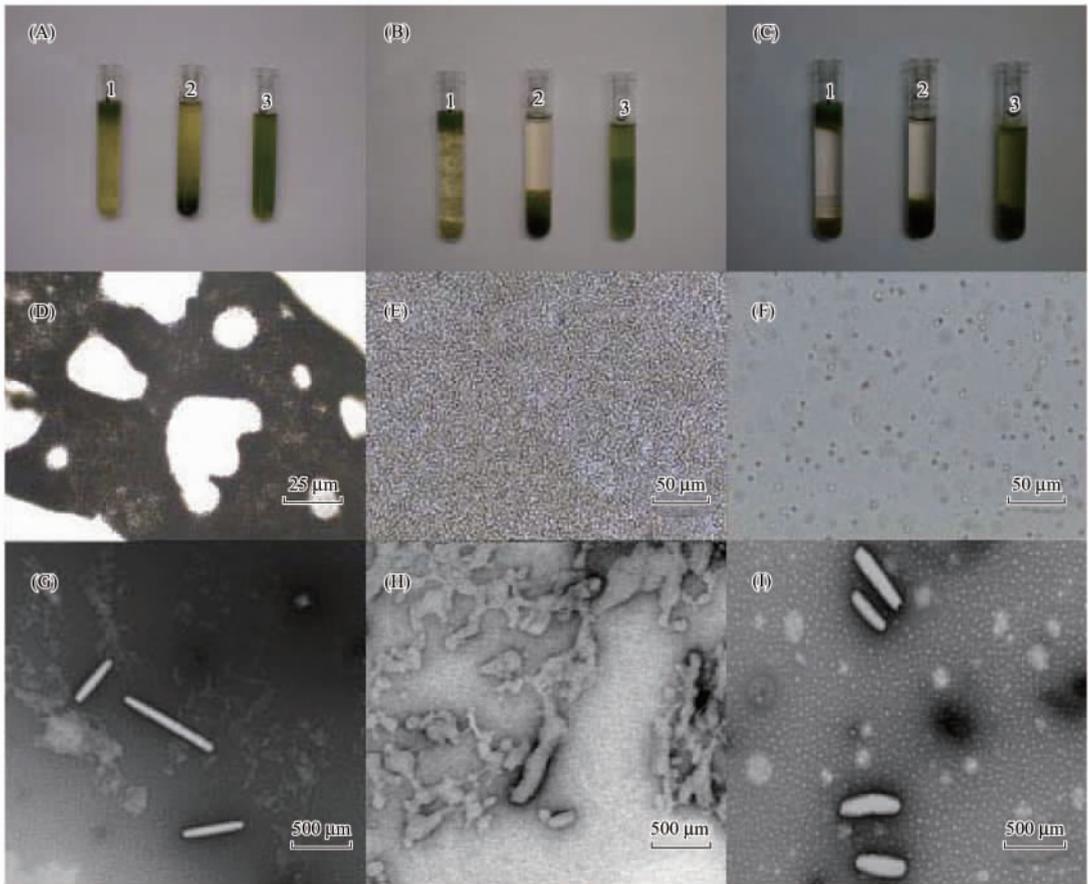
2.3 细胞间空隙的浮力研究

野外样品经过不同处理后,样品1蓝藻漂浮于水层表面,样品2蓝藻均都下沉,样品3蓝藻细胞悬浮于水中(图6A~6C).细胞形态有较大差异:样品1中蓝藻群体细胞内部有很大的细胞间空隙(图6D),样品2中蓝藻细胞结合紧密,无细胞间空隙(图6E);样品3蓝藻呈游离的单细胞状态(图6F).而负染色电镜发现样品1和样品3中的伪空胞形态完整(图6G,6I),而样品2中的伪空胞塌陷(图6H).由此可见,伪空胞是蓝藻细胞上浮或悬浮的主要因素,而细胞间空隙是蓝藻水华形成的主要浮力因素。

3 讨论

伪空胞一直被认为蓝藻水华形成的浮力主要提供者^[1,2,12~19],但是蓝藻水华形成的各个阶段,伪空胞是否是主要的浮力提供者并不清楚,目前文献并没有涉及到该研究内容.在静水中,水体运动、风向和群落大小等因素也会影响浮游蓝藻的分布^[20].本课题组其他研究结果表明,蓝藻上浮过程中伪空胞的气体相对含量先增后减,说明伪空胞为蓝藻提供浮力先增后减;基因转录结果也证实:*gvpA*的拷贝和*gvpC*基因的转录水平趋势与伪空胞的相对气体含量的变化趋势一致(另有文章发表).因此笔者认为伪空胞是蓝藻上浮的主要浮力提供者,该浮力仅能使蓝藻悬浮水中,不能使其漂浮到水面形成蓝藻水华.故悬浮水体中的蓝藻上浮至水面形成水华过程中,肯定存在另外的浮力提供者。

本研究镜检发现野外未经处理的样品1内具有大量的细胞间空隙(图6D),而且伪空胞完整(图6G),蓝藻群体在水面形成了水华;处理样品2经1.0 MPa压力处理后,细胞群体内没有细胞间空隙(图6E),也没有发现完整的伪空胞(图6H),藻细胞均都沉淀试管底部;而样品3经40 Hz超声波处理1 min后,伪空胞完整(图6I),藻细胞成悬浮状(图6F),无群体形成,无细胞间空隙.比对样品1和2的群体及伪空胞的形态,说明蓝藻形成水华的浮力是由伪空胞和细胞间空隙共同提供;比对样品2



A: 样品处理后第 1 d 的形态; B: 样品处理后第 3 d 的形态; C: 样品处理后第 5 d 的形态; D: 样品 1 第 1 d 蓝藻群体的形态;
E: 样品 2 第 1 d 蓝藻群体的形态; F: 样品 3 第 1 d 蓝藻的形态; G: 样品 1 第 1 d 伪空胞的形态; H: 样品 2 第 1 d 伪空胞的形态;
I: 样品 3 第 1 d 伪空胞的形态; A ~ C: 普通光学照片; D ~ F: 显微镜照片; G ~ I: 电镜照片

图 6 野外样品处理前后群体和伪空胞形态变化

Fig. 6 Morphology of the aggregates and gas vesicles in three treated natural samples

和 3 群体和伪空胞的形态可知: 伪空胞是蓝藻上浮的主要浮力提供者, 该浮力仅仅能使蓝藻悬浮水中, 不能使其漂浮到水面形成蓝藻水华. 比对样品 1 和 3 群体和伪空胞的形态, 证明了细胞间空隙是悬浮水体中的藻细胞上升至水面形成水华的主要浮力提供者. 综合比对样品 1、2 和 3 的群体和伪空胞的形态, 说明伪空胞是蓝藻上升阶段的浮力提供者, 此浮力仅仅能使藻细胞悬浮水体, 不能使其形成水华, 而细胞间空隙可以为悬浮在水中的藻细胞或蓝藻群体提供足够浮力, 使其上浮到水面形成蓝藻水华. 但是由于实验设备和实验条件的原因, 目前还无法准确检测野外群体内部细胞间空隙的气体含量, 也无法准确地检测野外群体内部细胞间空隙的密度, 因此也无法定量地分析细胞间空隙为蓝藻提供浮力的大小, 只能通过比对不同处理样品(样品 1~3)群体及伪空胞的形态, 定性分析细胞间空隙对蓝藻上浮提供浮力的影响.

形成蓝藻群体是细胞间空隙形成的前提, 而胞外多糖一直被认为形成蓝藻群体的重要诱导因子, 蓝藻胞外多糖中荚膜和黏液层可以将蓝藻单细胞黏着成群体^[5~7,21,22]. 由于野外样品受到风浪等诸多因素的影响, 野外所取样品并不能真正反映某一水层的蓝藻群体内细胞数量和胞外多糖的关系, 因此本研究利用室内模拟实验, 在静止水体中测量了不同水层的细胞数量和细胞镇重物, 实验结果发现胞外多糖和蓝藻形态有密切关系: 室内蓝藻培养 30 d 后, 蓝藻形态在取样口 1~5 呈单细胞, 在取样口 6 处呈小群体(图 3); 细胞镇重物中, 胞外多糖含量在取样口 1~6 之间差异变化最大, 两者相差 3.7 倍, 而细胞干重和蛋白质的含量在取样口 1~6 之间差异不显著. 因此实验结果暗示胞外多糖可能就是蓝藻形成群体的重要因子, 该室内模拟实验结果结合野外样品照片, 也证实了胞外多糖是蓝藻群体形成细胞间空隙的重要因子.

大量蓝藻细胞由悬浮水体中单细胞变为群体,并在水面形成水华,究其原因可能是随着蓝藻细胞的上浮,细胞镇重物增加,但增加的量不足以抵消伪空胞提供的浮力,当细胞镇重物产生的重力与伪空胞提供的浮力达到平衡时,藻细胞停留在水体中某一位置(本实验显示大部分藻细胞停留在取样口5处),由于此处靠近液面,光照条件改善,更加有利于蓝藻光合作用,从而产生更多的胞外多糖^[19,21],使蓝藻细胞具有更强的黏滞性,更有利于蓝藻形成群体,形成更多的蓝藻群体细胞间空隙.大量的细胞间空隙不仅抵消了细胞镇重物产生的重力,而且也为蓝藻群体提供了强大的浮力,其蓝藻群体漂浮在水面形成水华.

4 结论

(1)在室内水柱模拟实验中,蓝藻在上浮过程中以单细胞形态存在,但在接近水面时发现蓝藻小群体.

(2)细胞间空隙不仅抵消了细胞镇重物产生的重力,而且也为蓝藻群体提供浮力,使其蓝藻群体漂浮在水面形成水华.

(3)胞外多糖是细胞间空隙形成的原因.

参考文献:

[1] Oliver R L, Ganf G G. Freshwater blooms [A]. In: Whitton B A, Potts M (eds). The Ecology of Cyanobacteria [C]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. 149-194.

[2] Bonnet M P, Poulin M. Numerical modeling of the planktonic succession in a nutrient-rich reservoir: environmental and physiological factors leading to *Microcystis aeruginosa* dominance [J]. Ecological Model, 2002, **156**: 93-112.

[3] 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[J]. 生态学报, 2005, **25**(3): 589-595.

[4] Hayes P K, Walsby A E. An investigation into the recycling of gas vesicle protein derived from collapsed gas vesicles [J]. Journal of General Microbiology, 1984, **130**: 1591-1596.

[5] De Philippis R, Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications [J]. FEMS Microbiology Reviews, 1998, **22**: 151-175.

[6] 苏传东. 蓝杆藻 113 菌株(*Cyanothece* sp. 113)胞外多糖的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.

[7] Zhang M, Kong F X, Tan X, et al. Biochemical, morphological, and genetic variations in *Microcystis aeruginosa* due to colony disaggregation [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, **23**: 663-670.

[8] Fairbairn N J. A modified anthrone reagent [J]. Chemistry and

Industry, 1953, **4**: 86.

[9] Hebbert D P J, Phipps P J, Strange R W. Chemical analysis of microbial cells [A]. In: Norris J R, Ribbons D W (eds). Method in microbiology. V. 5B [C]. London: Academic Press, 1971. 209-344.

[10] Chi Z, Zhao S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast [J]. Enzyme Microbiology Technology, 2003, **32**: 206-211.

[11] Weathers P J, Jost M, Lamport D T A. The gas vacuole membrane of *Microcystis aeruginosa*. A partial amino acid sequence [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1977, **178**: 226-244.

[12] Oliver R L, Walsby A E. Direct evidence for the role of light mediated gas vesicle collapse in the buoyancy regulation of *Anabaena flosaquae* (cyanobacteria) [J]. Limnology and Oceanography, 1984, **29**: 879-886.

[13] Walsby A E. Homeostasis in buoyancy regulation by planktonic cyanobacteria [J]. FEMS Symposium, 1988, **44**: 99-116.

[14] Walsby A E. The gas vesicle: a stable gas-filled structure in bacteria [A]. In: Brubakk A O, Hemmingsen B B, Sundnes G (eds). Supersaturation and Bubble Formation in Fluids and Organisms [C]. Trondheim, Norway: Tapir Publishers, 1989. 69-103.

[15] Kinsman R, Ibelings B W, Walsby A E. Gas vesicle collapse by turgor pressure and its role in buoyancy regulation by *Anabaena flosaquae* [J]. Journal of General Microbiology, 1991, **137**: 1171-1178.

[16] Walsby A E. Gas vesicles [J]. Microbiology Reviews, 1994, **58**: 94-144.

[17] 成慧敏, 邱保胜. 蓝藻的伪空胞及其对蓝藻在水体中垂直分布的调节[J]. 植物生理学通讯, 2006, **42**(5): 974-980.

[18] Beard S J, Davis P A, Iglesias-Rodríguez D. Gas vesicle genes in *Planktothrix* spp. from Nordic lakes: strains with weak gas vesicles possess a longer variant of *gvpC* [J]. Microbiology, 2000, **146**: 2009-2018.

[19] Walsby A E. Gas vesicles and buoyancy in cyanobacteria: interrelations with light [A]. In: Caddick M X, Baumberg S, Hodgson D A, et al (eds). Microbial Responses to Light and Time [C]. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 69-93.

[20] 阳振. 微囊藻群体形成的驱动因子研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2010.

[21] Wallace B B, Bailey M C, Hamilton D P. Simulation of vertical position of buoyancy regulating *Microcystis aeruginosa* in a shallow eutrophic lake [J]. Aquatic Science, 2000, **62**: 320-333.

[22] Walsby A E, Ng G, Dunn C, et al. Comparison of the depth where *Planktothrix rubescens* stratifies and the depth where the daily insolation supports its neutral buoyancy [J]. New Phytologist, 2004, **162**: 133-145.