

蓝藻水华新种——螺旋浮丝藻(*Planktothrix spiroides*)的生理特征研究

王钰亮, 刘洋, 潘文静, 李效宇

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:螺旋浮丝藻(*Planktothrix spiroides*)是一类新发现的浮丝藻(*Planktothrix*)种类,常常与淡水节旋藻(*Arthrospira*)相混淆,同时螺旋浮丝藻也是常见的水华优势种类之一。本研究对分离自北方新乡市区的螺旋浮丝藻进行了鉴定并对其生理特征进行了描述。通过对其脂肪酸组成的研究,发此藻株含有C18:3 α ,相对含量为18.22,而不含有C18:3 γ 。对不同温度下(5℃、15℃、25℃、30℃)该藻株的生长速率、藻蓝蛋白(C-PC)比例及叶绿素光诱导荧光动力学曲线研究发现,此藻株耐低温性能较差,5℃时生长不良,其他温度下未表现出受胁迫特征。

关键词:蓝藻,螺旋浮丝藻,牧野湖,脂肪酸,叶绿素荧光

中图分类号:Q178.1

文献标志码:A

富营养化水体常常伴随大量的蓝藻产生,不仅发生在一些自然湖泊,还包括许多人工湖泊^[1]。在这些水体中占优势种类常常是微囊藻(*Microcystis*),同时还伴随着其他种类,如鱼腥藻(*Anabaena*),束丝藻(*Aphanizomenon*),浮丝藻(*Planktothrix*)等^[2]。通过对这些水华蓝藻的优势种类进行深入研究,一些混淆的种类逐渐被澄清,如新近报道的螺旋浮丝藻(*Planktothrix spiroides* sp. nov.)^[3]。由于此类蓝藻同样具有丝状、螺旋等形态学特征,一些研究者常常将其归为节旋藻属(*Arthrospira*)。虽然节旋藻属的种类大部分存在于碱性水体,但也有报道存在于淡水的类群,如,*A. masartii* Kufferath(泉水),*A. okensis* C. Meyer(溪流),*A. indica* Desikachary(池塘)^[4-5],我国已经报道的有4个种类。通过分子和生理的证据,已将螺旋浮丝藻从淡水节旋藻类群中划分出来,独立为新的种类^[6]。

野外调查发现螺旋浮丝藻分布于我国的长江中下游及南方的部分水体,并常常伴随微囊藻等存在,未形成优势类群^[6]。本研究首次发现其在黄河以北的新乡市区的河道及河道拓宽所形成的湖泊水域形成优势类群,并长时间维持。目前关于螺旋浮丝藻的生理研究未见报道,对其形成野外优势的特性缺乏数据支持。因此,我们分离并纯化了藻株,对其生理参数进行了研究,为深入了解该藻种在野外水体形成优势类群的机理提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 藻种采集和培养

本实验研究区域位于新乡市区牧野湖区域及其河道(图1),该区域属于温带-亚热带季风气候,四季分明,平均降水量约为656 mm,雨季集中在6月到9月,年日照总时长为2400 h。牧野湖是新乡市重点规划的兼具休闲、防洪等功能的人工湖泊,总面积达 2.23×10^5 m²,平均水深3 m^[7]。

用25号浮游生物网在水体表面作“∞”状拖网数次,收集样品于采样瓶中,将新鲜样品带回实验室镜检。用Olympus BX51显微镜观察并拍摄样品,通过软件Image-pro express 5.1图像分析。参考Anagnostidis和

收稿日期:2016-05-26;修回日期:2016-10-09。

基金项目:国家自然科学基金(31400395);国家博士后基金(2014M552006);河南省科技厅国际合作项目(144300510046);河南师范大学博士基金(qd13034)。

作者简介(通信作者):刘洋(1983-),男,河南新乡人,河南师范大学讲师,博士,研究方向为蓝藻分子生态,E-mail:ly@htu.cn。

Komárek^[8], Liu, et al.^[3]和 Komárek 和 Anagnostidis^[9]的方法进行鉴定. 运用毛细管法对目标藻株进行分离, 并放置于 BG11 培养基中^[10]培养, 培养条件为: 光强 $30 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光周期 12 h : 12 h.



(a): 湖区照片 (b): 河道照片)

图1 牧野湖湖区

1.2 不同温度条件下比生长速率(μ)的测定

分别设定温度梯度为 $(5^\circ\text{C}, 15^\circ\text{C}, 25^\circ\text{C}, 30^\circ\text{C}) \pm 1^\circ\text{C}$ 4 个梯度进行试验, 根据叶绿素 a 含量的变化, 实验进行 20 d, 比生长率的计算公式为: $\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$, x_1, x_2 分别表示对数生长期开始时 (t_1) 和结束时 (t_2) 的藻类现存量. 叶绿素 a 的提取和测定参照 Mush^[11].

1.3 藻胆蛋白的测定

藻胆蛋白含量的测定参考 Padgett 方法^[12], 取 5 mL 培养藻液, 1 000 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 5 mL PBS (0.05 M, pH 6.8). 超声破碎, 1 000 g 离心 5 min, 上清液分别测定 620 nm, 650 nm 下的吸光值, 根据下列公式计算^[12].

$$\text{藻蓝蛋白 PC}(\text{mg}/\text{ml}) = (\text{OD}_{620} - 0.7\text{OD}_{650}) / 7.38.$$

1.4 脂肪酸的提取与测定

脂肪酸提取参照文献^[13]中. 室温用氮气吹干后, 用 100 μL 正己烷溶解, 置于 -20°C 保存待测. 用岛津-2014C 型气象色谱仪 (Shimadzu, 日本) 及 FFAP 型毛细管色谱柱 ($30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm} \times 0.33 \mu\text{m}$, 中科院兰州化物所色谱中心). 检测器为氢火焰离子化检测器 (FID), 载气为氮气, 压力控制 150 kPa. 色谱柱温度设定: 150°C 保持 1 min, 以每分钟 15°C 为速率升温至 200°C , 再以每分钟 2°C 为速率升温至 250°C , 保持 6 min. 进样口温度为 240°C , 检测器 (FID) 温度为 260°C . 压力设定: 空气 40 kPa, 氢气 45 kPa, 氮气 100 kPa. 脂肪酸标准品为 F. A. M. E. Mix C14-C22 (SUPELCO, 美国). 通过比较标准品确定样品所含脂肪酸, 依据峰面积确定脂肪酸相对组成比例.

1.5 叶绿素荧光多相瞬态上升动力学参数测定及分析

不同温度下的叶绿素荧光多相瞬态上升动力学用水体叶绿素荧光仪 (AquaPen-C AP-C 100, Photon Systems Instruments, The Czech Republic) 测定, 光化光强为 $3\,000 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 荧光瞬时上升曲线的记录时间为 $50 \mu\text{s} \sim 1 \text{ s}$, 采样速率在 2 ms 之内是 105 次/s, 2 ms 之后为 103 次/s. 测定前, 所有样品充分暗适应 (15 min)^[14].

1.6 数据分析

所有实验重复 3 次, 数据分析采用 SPSS 13.0 (SPSS Inc.) 统计方式 One-way ANOVA, LSD 方法进行两两比较, $P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 差异极显著.

2 结果

2.1 螺旋浮丝藻形态特征

藻丝体单生, 自由漂浮, 呈螺旋状, 本实验所分离的藻丝 (图 2) 平均宽度为 $5.6 \mu\text{m}$, 螺旋平均宽度为

36 μm , 平均高为 40 μm , 细胞圆柱形, 具伪空胞结构。

2.2 螺旋浮丝藻在不同温度条件下的比生长速率(μ)

实验测定发现 5 $^{\circ}\text{C}$ 、15 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 的比生长速率(μ)分别为 0.03 ± 0.01 、 0.09 ± 0.02 、 0.22 ± 0.05 、 0.03 ± 0.03 , 培养过程中 5 $^{\circ}\text{C}$ 下藻丝生长缓慢, 且颜色发黄; 25 $^{\circ}\text{C}$ 下螺旋浮丝藻的生长速率较高 ($P < 0.05$)。

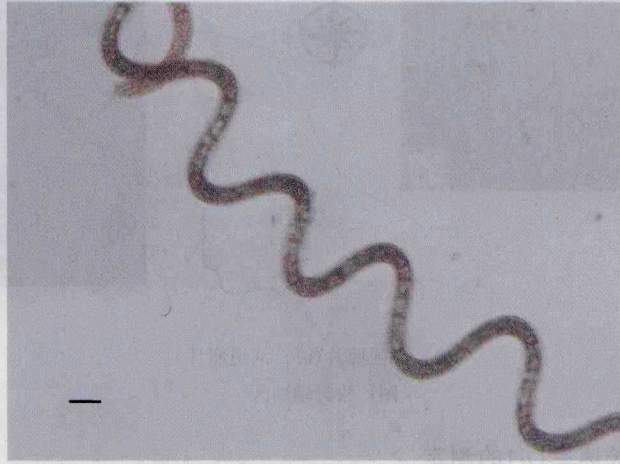


图2 显微镜下 *P. spiroides* 形态 (标尺=10 μm)

2.3 螺旋浮丝藻藻蓝蛋白含量

对不同温度下第 10 d 螺旋浮丝藻进行藻蓝蛋白的检测发现, 5 $^{\circ}\text{C}$ 下单位叶绿素藻蓝蛋白含量显著降低 ($P < 0.05$), 其余温度下藻蓝蛋白比例变化不显著。

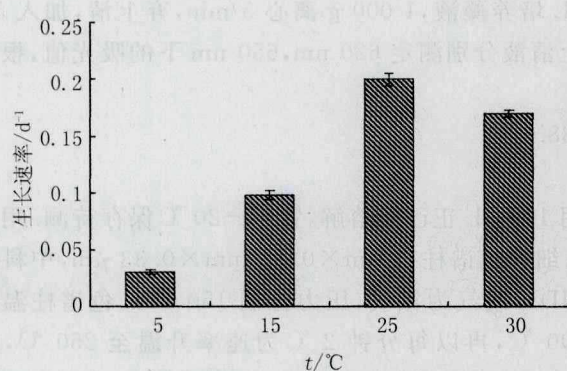


图3 不同温度下螺旋浮丝藻的比生长速率比较

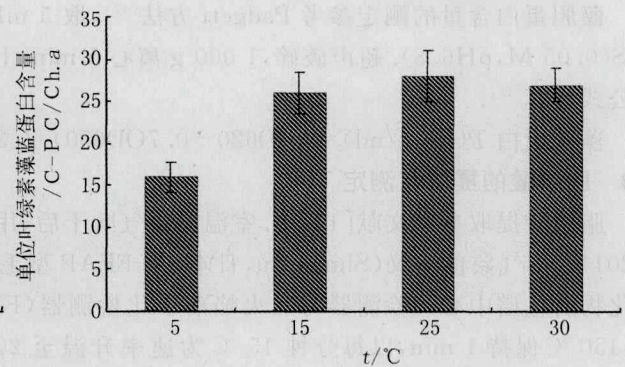


图4 不同温度下藻蓝蛋白相对含量

2.4 螺旋浮丝藻脂肪酸组成

对螺旋浮丝藻的脂肪酸进行测定(图 5), 发现其主要含有 C14 : 0、C16 : 0 及 C18 : 0 三类长链饱和脂肪酸, 其相对含量分别为 0.55, 40.56, 0.57; 单不饱和脂肪酸以 C16 : 1、C18 : 1 为主, 其相对含量分别为 22.55, 4.12; 多不饱和脂肪酸以 C16 : 2、C18 : 2、C18 : 3 α 为主, 其含量分别为 1.95, 11.56, 18.22. 未检测到 C18 : 3 γ 和 C18 : 4. 由于其含有 16 : 0、16 : 1 和 16 : 2 三种, 故可以认定为 II 类型. 这与 Suda 对颤藻目藻株测定的结果相吻合^[15].

2.5 不同温度下螺旋浮丝藻叶绿素光诱导荧光动力学特征

图 6 分别显示了螺旋浮丝藻在 5 $^{\circ}\text{C}$ 、15 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 4 个温度下叶绿素光诱导荧光多项瞬态上升动力学特征在第 10 d 和第 20 d 的变化情况. 从图上可以看出在 15 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 温度下培养 10 d, 螺旋浮丝藻的叶绿素光诱导荧光多项瞬态上升动力学呈典型的 O-J-I-P 特征, 而 5 $^{\circ}\text{C}$ 下培养的第 10 d, 叶绿素光诱导荧光多项瞬态上升动力学曲线 I 相和 P 相基本消失; 培养 20 d 后, 15 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 各温度下螺旋浮丝藻的叶绿素光诱导荧光多项瞬态上升动力学仍呈典型的 O-J-I-P 特征, 而 5 $^{\circ}\text{C}$ 的螺旋浮丝藻的叶绿素光诱导荧光多项瞬态上升动力学曲线特征基本消失。

3 讨 论

富营养水体为蓝藻水华的生长提供了很好的水生态环境,蓝藻水华的大规模暴发不仅与其所处的环境条件相关,也与蓝藻本身的生理特性密不可分.在我国微囊藻水华是众多蓝藻种类的优势种^[1],我国的“三湖”均含有微囊藻,除此之外,还常常伴有鱼腥藻和束丝藻等^[2,6].在欧洲浮丝藻等丝状水华常常成为优势种类占据着不同生境.虽然在我国也有浮丝藻水华的报道,但相对于微囊藻水华的研究,浮丝藻水华研究较少,一方面与其自身的分布相关,另一方面与其在分类学上的模糊性相关.在前期对浮丝藻分类学的深入讨论基础上,我们新发现了浮丝藻属的新种——螺旋浮丝藻,并在国际上首先报道^[3].而最近,我们在黄河以北的新乡市水体采样发现,该种藻已成为水体中的绝对优势种群(图 1),因此很有必要对其生理特性进行研究.

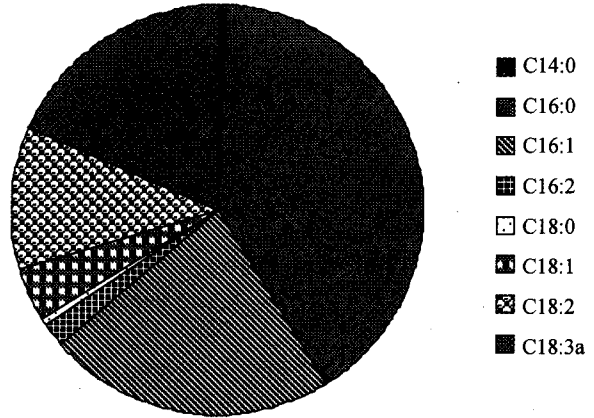


图5 螺旋浮丝藻脂肪酸组成

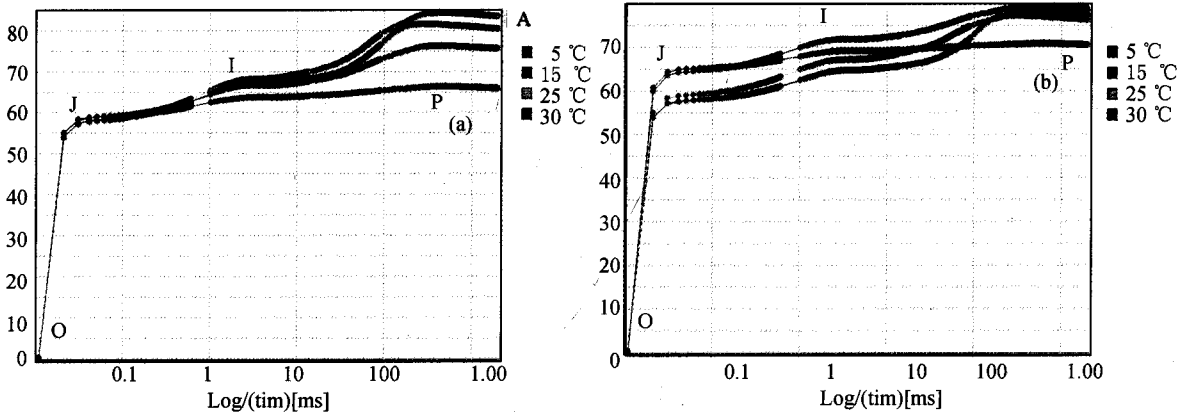


图6 不同温度下螺旋浮丝藻叶绿素光诱导动力学特征 (a: 10 d; b: 20 d)

化学指标也常常作为分类学上的重要证据. Kenyon 将蓝藻按脂肪酸分为 4 种类型,含有 C18 : 3 α 脂肪酸为类型 II,含有 C18 : 4 的为 IV 型^[16].在对浮丝藻属的研究发现,其属内种类常常含有 C18 : 3 α ,因此浮丝藻属于 II 型,此为判定浮丝藻的重要特性之一.对本研究中藻株脂肪酸的分析表明其含有 C18 : 3 α ,而缺少 C18 : 3 γ 和 C18 : 4.对于不同地域气候条件的长期适应,相同种属的藻株常常形成特有的生理特性.通过对优势蓝藻种群的研究,发现微囊藻能适应较高的温度^[17],而丝状藻类的最适温度常常低于微囊藻^[18-19].通过对藻株的比生长速率,能够间接反映其最适合的生长温度,结合光合特性的研究,能够很好了解藻株的生理特性.藻类的叶绿素荧光与 PSII 反应中心及反应中心电子的氧化还原状态密切相关,通过对藻株的叶绿素光诱导动力学曲线分析,可以反映出藻株的生理活性.对不同温度(5 °C、15 °C、25 °C、30 °C)下的生长活性进行叶绿素光诱导荧光多项瞬态上升动力学研究发现,本研究的螺旋浮丝藻在 5 °C 时 I 相和 P 相消失,表明其不适应低温生长,同时 5 °C 时,藻蓝蛋白比例有所降低,这可能与它受到低温胁迫相关,导致光合效率的降低.而在 25 °C 和 30 °C 时表现出较好的光合活性,这也间接反映出本藻株能够在 5 月至 10 月份长期优势主导野外水体.本研究探讨了螺旋浮丝藻这一新种的部分生理特性,为今后对其他地域螺旋浮丝藻的研究及水华治理提供参考.

参 考 文 献

[1] 马健荣,邓建明,秦伯强,等. 湖泊蓝藻水华发生机理研究进展[J]. 生态学报, 2013, 33(10): 3020-3030.
 [2] Liu Y, Xu Y, Xiao P, et al. Genetic analysis on *Dolichospermum* (Cyanobacteria; sensu *Anabaena*) populations based on the culture-in-

- dependent clone libraries revealed the dominant genotypes existing in Lake Taihu, China[J]. *Harmful Algae*, 2014, 31(1):76-81.
- [3] Liu Y, Wang Z J, Lin S, et al. Polyphasic characterization of *Planktothrix spiroides* sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria), a freshwater bloom-forming algae superficially resembling *Arthrospira*. *Phycologia*[J]. 2013, 52(4):326-332.
- [4] Ballot A, Dadheech P K, Krienitz L. Phylogenetic relationship of *Arthrospira*, *Phormidium* and *Spirulina* strains from Kenyan and Indian waterbodies[J]. *Algological Studies*, 2004, 113(1):37-56.
- [5] Mussagy A, Wilmotte A, Cronberg G. The cyanophyte *Arthrospira fusiformis* from Mozambique, Africa: morphological and molecular characterization[J]. *Algological Studies*, 2006, 121(1):59-73.
- [6] 林 燊. 丝状水华蓝藻多样性及生态应用研究[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所, 2011.
- [7] 杨 程. 新乡市牧野湖浮游植物群落时空动态及其与水环境因子的相关性分析[D]. 新乡:河南师范大学, 2014.
- [8] Anagnostidis K, Komárek J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3-Oscillatoriales[J]. *Algological Studies*, 1988 (50-53):327-472.
- [9] Komárek J, Anagnostidis K. Bd. 19/2; Cyanoprokaryota; teil 2: Oscillatoriales[M]. München; Elsevier, 2005.
- [10] Rippka R. Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae[J]. *Archiv für Mikrobiologie*, 1972, 87(1):93-98.
- [11] Mush E A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination[J]. *Arch. Hydrobiol. Beih*, 1980, 14: 14-36.
- [12] Padgett M P, Krogmann D W. Large scale preparation of pure phycobiliproteins[J]. *Photosynthesis Research*, 1987, 11(3): 225-235.
- [13] Mühling M, Belay A, Whitton B A. Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2005, 17(2): 137-146.
- [14] 刘彦彦, 邵继海, 刘德明, 等. 白屈菜红碱对铜绿微囊藻生长和光合系统的影响[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(1):149-154.
- [15] Suda S, Watanabe M M, Otsuka S, et al. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(5): 1577-1595.
- [16] Kenyon C N. Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae[J]. *Journal of bacteriology*, 1972, 109(2):827-834.
- [17] 秦红杰, 李敦海. 铜绿微囊藻高温胁迫后的超补偿生长[J]. *环境科学*, 2010, 31(7):1504-1509.
- [18] 林 燊, 彭欣, 吴忠兴, 等. 我国水华蓝藻的新类群——阿氏浮丝藻(*Planktothrix agardhii*)生理特性[J]. *湖泊科学*, 2008, 20(4):437-442.
- [19] 潘倩倩, 朱梦灵, 刘 洋, 等. 阿氏浮丝藻 *mcyT* 基因序列多样性研究[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(1):92-99.

Physiological Characteristics Evaluation of *Planktothrix Spiroides*—A New Species of Bloom-forming Cyanobacteria

WANG Yuliang, LIU Yang, PAN Wenjing, LI Xiaoyu

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: *Planktothrix spiroides* is a new species which is usually confused with the freshwater *Arthrospira*. *P. spiroides* is the dominated cyanobacterium in freshwater bodies. The present study aimed to evaluate the physiological characteristics of *P. spiroides* isolated from the north area of China. The results of fatty acid composition analysis showed that the strain contained C18 : 3 α (18.22 relative content) instead of C18 : 3 γ in *Arthrospira*. In addition, we also found that it did not tolerant of the low temperature via the determination of their growth rate, pigment composition and chlorophyll fluorescence transient.

Keywords: Cyanobacteria; *Planktothrix spiroides*; Muye Lake; fatty acid; chlorophyll fluorescence