

# 爪哇曲壳藻亚缢变种 (*Achnanthes javanica* **var Meister**)胞外多聚物分泌过程 及除草剂的影响研究\*

黄世玉 王大志<sup>1)</sup>

(集美大学水产学院 厦门 361021)

(近海海洋环境科学国家重点实验室/环境科学研究中心 厦门大学 厦门 361005)

**提要** 采用微孔板培养法,研究了爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物的分泌过程及除草剂对该过程的影响。结果表明,爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物的分泌过程分为 4 期:即单细胞形成及重新定位期、球状体形成期、领形成和柄延伸期及细胞分裂增殖期。除草剂对胞外多聚物分泌的影响与其浓度有关:当除草剂浓度为  $10 \times 10^{-6}$  时,除草剂对爪哇曲壳藻亚缢变种单细胞的形成和运动没有影响,但胞外多聚物柄的生产受到抑制,柄的长度也明显缩短;随着除草剂浓度的进一步增加,群体细胞不能散开形成单细胞,胞外多聚物的分泌受到完全抑制。本研究结果表明,爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物的分泌与细胞运动有关,除草剂可能影响了细胞内有机物质的合成和某些细胞器(如囊泡)的功能,从而抑制了胞外多聚物的分泌。

**关键词** 爪哇曲壳藻亚缢变种,胞外多聚物,分泌过程,除草剂

**中图分类号** Q942

研究表明,许多硅藻,尤其是附着硅藻在其生命活动过程中均能生产分泌一类粘性物质,称为胞外多聚物(Extracellular Polymeric Substances EPSs),它是硅藻生命过程中不可或缺的一部分,在硅藻运动、附着、栖息地的稳定、集群及抗干燥等方面都起着重要的作用(Hoagland *et al.* 1993)。硅藻胞外多聚物还是海洋碳的一个重要来源,可能直接参与海洋生态系统的碳循环、微食物环的组成、藻菌及藻-藻的相互作用过程等,在海洋生态系统中起着极其重要的作用(Lignell 1990, Smith *et al.* 1995, Goto *et al.* 1999)。此外,附着硅藻还是海洋污损生物的一个重要研究领域(Hoagland *et al.* 1993, 黄宗国等, 1984),附着硅藻不仅会增加轮船阻力,降低燃料效率,其分泌的胞外多聚物还会腐蚀水底建筑、轮船及其他物体表面(Aberte *et al.* 1992)。近 20 年来,在硅藻胞外多聚物的形态、细微结构、功能及化学组成等方面取得了重要进展

(Hoagland *et al.* 1993),在合成机制方面也开展了一些工作(Wustman *et al.* 1997, Wang *et al.* 1997),但目前对硅藻胞外多聚物的合成机制仍不是很清楚。Wang 等(1997)认为硅藻胞外多聚物的合成与硅藻运动和永久性附着有关,后两者直接导致了胞外多聚物的合成。

我国在海洋硅藻方面开展了大量的工作,特别是在底栖硅藻的分类生态学等方面取得了丰硕的成果(金德祥等, 1982, 1991; 程兆第等, 1995),在污损硅藻的生态分类及附着机制方面也开展了一些工作(黄宗国等, 1984),但有关硅藻胞外多聚物方面的研究报道较少。王大志等(2003, 2004a)研究了营养盐和光暗周期对浮游硅藻胞外多糖生产的影响,附着硅藻胞外多聚物的形态及细微结构等(王大志等, 2004b)。作者以爪哇曲壳藻亚缢变种(*Achnanthes javanica* var Meister)为模式种,采用微孔板培养的方法研究

\* 国家自然科学基金资助项目, 39900020 号。黄世玉, 副教授, E-mail hsy7878200@ yahoo.com.cn

1) 通讯作者: 王大志, 博士, 教授, E-mail dzwang@ xmu.edu.cn

收稿日期: 2005-02-27, 收修改稿日期: 2005-08-09

了硅藻胞外多聚物的分泌过程及除草剂对这一过程的影响,探讨了胞外多聚物的分泌机制,以期阐明硅藻胞外多聚物的合成机制及污损硅藻的防治提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 藻种

实验用藻种——爪哇曲壳藻亚缢变种 (*Achnanthes javanica* var Meister) 筛选自厦门海域的大型藻类上。藻细胞培养在装有 100ml *f/2* 培养液的 250ml 三角烧瓶中,光照强度为 4000 lx 光暗周期比 L:D 为 14:10 实验用藻种均采用接种后 4 天左右且色素体饱满的藻细胞,每次实验前均把藻细胞在消毒海水中洗 2—4 次,去除附着在藻体上的杂质。

### 1.2 胞外多聚物分泌过程研究

采用微孔板 (24 孔板) 培养的方法。每个微孔放入 1—3 串藻体 (约 30 个藻细胞), 加入 *f/2* 培养液 2ml 4h 后群体细胞开始散开, 将微孔板在光学显微镜下观察 ( $\times 40$ ), 选取 3—5 个视野较好的环面观的单细胞藻体, 对其进行定位并跟踪观察其胞外多聚物的分泌过程, 每 0.5h 观察一次并拍照。

### 1.3 除草剂对胞外多聚物分泌及细胞生长的影响

实验组选用 3 种除草剂: 农达、乙草胺和丁草胺。除草剂的配置采用 *f/2* 培养液稀释, 所用浓度均指有效成分浓度。每种除草剂分别设置  $10 \times 10^{-6}$ 、 $30 \times 10^{-6}$ 、 $50 \times 10^{-6}$  和  $80 \times 10^{-6}$  四个浓度梯度。在多孔板的每个微孔中放入 1—2 串藻体, 约 50 个细胞, 分别加入 4 个浓度梯度的 3 种除草剂各 2ml 在显微镜下观察其生长情况, 主要观察胞外多聚物-球状体和柄的形成及细胞分裂等并拍照, 在培养 72h 后用目微尺与台微尺测量柄的长度。

## 2 结果

### 2.1 爪哇曲壳藻胞外多聚物分泌过程

爪哇曲壳藻的胞外多聚物为透明的长柄状, 分为球状体 (斧状足)、杆和领三部分。显微镜观察结果表明, 爪哇曲壳藻胞外多聚物的分泌过程分为 4 个期:

**I 期 单细胞形成及重新定位期:** 藻体接种 4—5h 后, 细胞从群体脱离后贴着基底作无规律的向前后、或曲线形、或旋转运动, 以寻找合适的附着位置, 并在这一过程中不断调整方向, 以便使壳缝紧邻基底, 最后通过壳体暂时粘附于附着基上。

**II 期 球状体形成期:** 接种 6—8h 后, 细

胞停止运动, 从细胞下壳面凹陷面的一端开始形成一球状结构即球状体, 并永久性地粘附于附着基上 (图 1a)。

**III 期 领形成和柄延伸期:** 球状体形成后 2—4h 球状体连接细胞一侧不断伸长, 形成透明的杆状物, 连接细胞与球状体, 在柄的形成过程中领开始形成于近壳的部位, 球状体也逐渐变成斧足状 (图 1b—图 1h)。此外, 在这一过程中还观察到细胞色素体内有许多小泡在活跃地运动, 这些小泡的形状和大小在不断地变化。

**IV 期 细胞分裂增殖期:** 接种约 12h 后, 柄的长度和形状基本保持不变, 但细胞形态变化较大, 进入细胞分裂增殖期, 细胞明显变宽, 体积变大 (图 1i—图 1p), 细胞中部及左右两侧的色素体慢慢变空, 色素体聚集浓缩成等大的两块, 然后向上下两侧均匀拉伸, 两块色素体的中部变细, 上下两端变粗呈哑铃型 (图 1p), 接着在细胞上下壳面之间的中间部分出现模糊的未成熟的新壳即上细胞的下壳和下细胞的上壳 (图 1q), 新壳面通过两色素体中间最细的部分将细胞一分为二 (图 1q), 接着新壳面变得清晰, 可以清楚地看到肋纹和点纹 (图 1s)。由于有坚硬的胞外基质, 细胞分裂方向一般与群体的长轴垂直, 经过多次分裂细胞相连成串。

### 2.2 除草剂对爪哇曲壳藻胞外多聚物分泌及细胞生长的影响

三种除草剂对爪哇曲壳藻胞外多聚物分泌和细胞生长的影响见表 1。结果表明, 三种除草剂对爪哇曲壳藻胞外多聚物的分泌和细胞生长的影响基本一致。在正常生长条件下, 爪哇曲壳藻成簇生长, 以具有斧状足的一端粘附于基底或其他藻体上 (图 2a), 柄的平均长度达到 55 $\mu$ m。加入  $10 \times 10^{-6}$  的除草剂后, 对群体的散开及单细胞的形成没有影响, 但部分细胞运动受到影响, 胞外多聚物的分泌也受到显著抑制, 胞外多聚物的分泌量减少, 甚至有部分细胞不分泌胞外多聚物。大多数分泌胞外多聚物的细胞只有球状体或很短的柄, 只有少数细胞的柄较长, 但柄的长度明显变短: 农达组平均柄长 30 $\mu$ m, 乙草胺组平均柄长 27.5 $\mu$ m, 丁草胺组平均柄长 13 $\mu$ m。此外, 除草剂的存在抑制了细胞的分裂, 接种 72h 后, 细胞数目几乎没有增加, 细胞成串的数目也较少 (图 2b)。在  $30 \times 10^{-6}$  的浓度下, 爪哇曲壳藻单细胞的形成没有受到影响, 但大部分细胞不运动, 约 40% 的细胞有分泌球状体, 但几乎

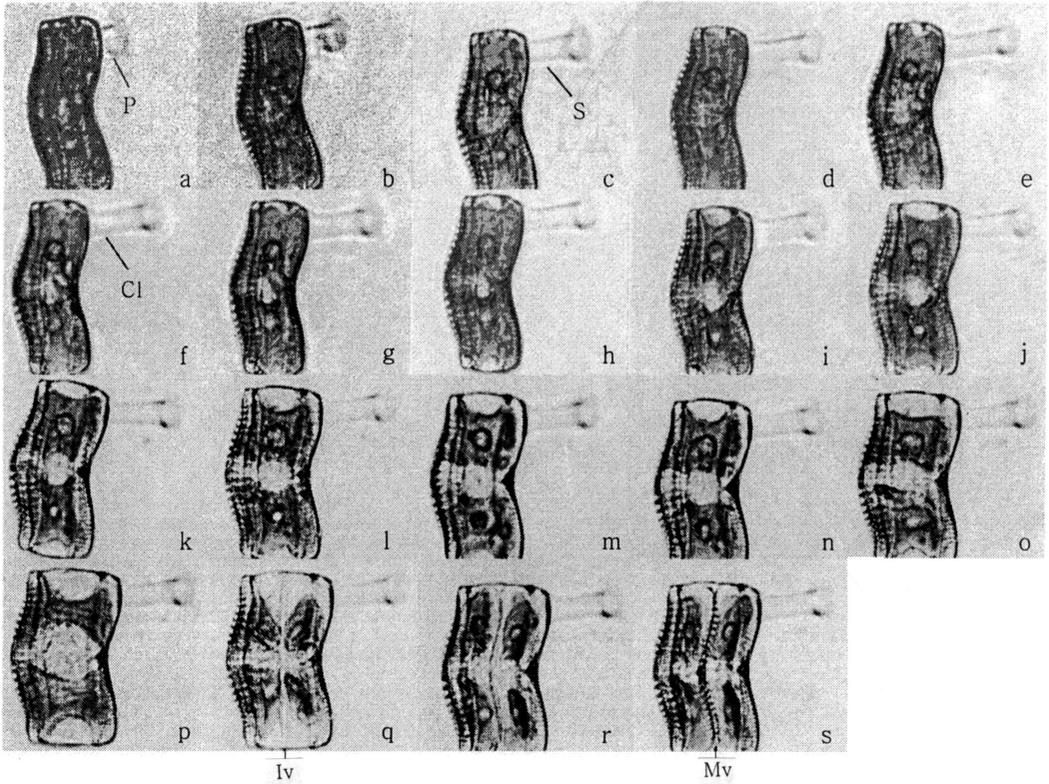


图 1 爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物分泌过程

Fig 1 Secretion process of EPS in *A. javanica* var *M eister*

P 斧足; S 杆; Cl 领; Iv 未成熟壳; M v 成熟壳

表 1 除草剂对爪哇曲壳藻胞外多聚物分泌及细胞生长的影响

Tab 1 Effects of herbicides on secretion of EPS and cell growth in *A. javanica* var *M eister*

藻细胞参数			
除草剂浓度	多细胞群体散开及单细胞形成	胞外多聚物分泌及柄长度	细胞分裂增殖
对照组	接种 4h 后基本散开, 形成单细胞, 细胞自由运动	接种 12h 后全部分泌胞外多聚物且柄较长, 平均长度为 55 $\mu$ m ( $n = 40$ )	接种 72h 后, 多细胞链约 250 串, 单细胞约 130 个, 有些藻体聚集在一起成簇
$10 \times 10^{-6}$	接种 4h 后基本散开, 形成单细胞, 大部分细胞具运动能力	接种 12h 后, 约 60% 细胞分泌胞外多聚物, 其中约 20% 细胞的柄较长: 农达组平均 30 $\mu$ m ( $n = 8$ ), 乙草胺组平均 27.5 $\mu$ m ( $n = 5$ ), 丁草胺组平均 13 $\mu$ m ( $n = 5$ )	接种 72h 后细胞数目几乎没有增加, 大部分为单细胞, 个别为多细胞 (2—10 个)
$30 \times 10^{-6}$	接种 5h 后基本散开形成单细胞, 大部分细胞不运动	接种 12h 后, 约 40% 细胞分泌球状体, 但观察不到可测量的柄	无
$50 \times 10^{-6}$	几乎不散开	无	无 (72h 后个别藻体色素体褪色)
$80 \times 10^{-6}$	完全不散开	无	无 (72h 后一些藻体色素体褪色)

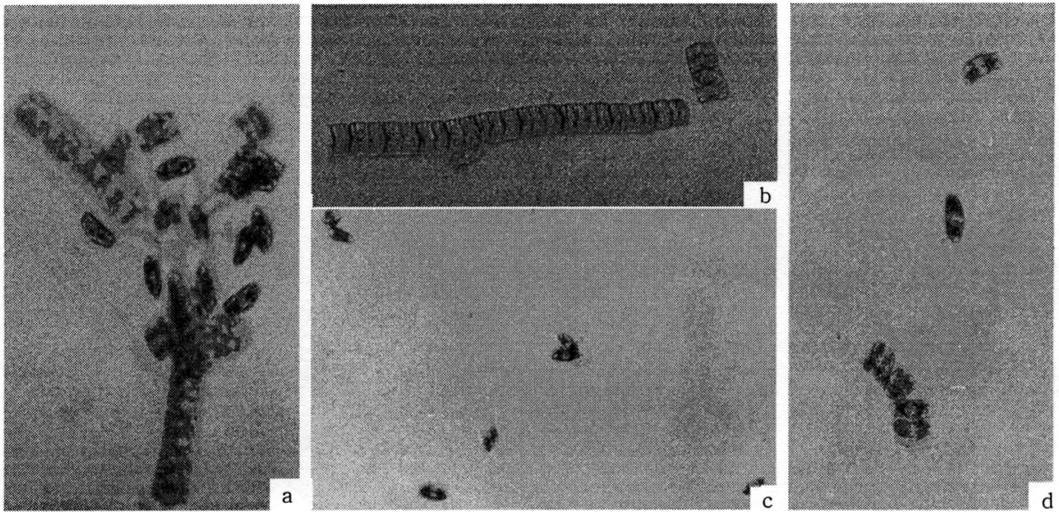


图 2 除草剂对爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物分泌过程的影响

Fig 2 Effects of herbicides on secretion of EPS in *A. jwanica* var Meister

a 空白组 (接种 72h 后); b  $80 \times 10^{-6}$  浓度组 (农达接种 72h 后); c  $10 \times 10^{-6}$  浓度组 (农达接种 100h 后);  
d  $30 \times 10^{-6}$  浓度组 (丁草胺接种 100h 后)

观察不到可测量的柄 (图 2c)。随着除草剂浓度的进一步增加 ( $50 \times 10^{-6}$ 、 $80 \times 10^{-6}$ ), 群体细胞不能散开形成单细胞, 胞外多聚物的分泌受到完全抑制 (图 2d)。

### 3 讨论与结论

本研究结果与 Wang 等 (1997) 报道的对长柄曲壳藻胞外多聚物分泌过程的描述基本一致。两种曲壳藻胞外多聚物的分泌过程均分为 4 个期: 单细胞形成及重新定位期、球状体形成期、柄形成和柄延伸期及细胞分裂增殖期。此外, 本研究和 Wang 等 (1997) 的研究还表明, 只有当胞外多聚物 (柄) 形成后, 细胞才能进行分裂增殖, 这表明胞外多聚物的生产在曲壳藻的生命活动中占有极其重要的地位, 直接关系到细胞的生长和繁殖。柄的作用可能使硅藻细胞保持稳定, 同时使细胞具有竞争养分和光线的优势。另外, 柄的形成也可能是细胞分裂前的一个信号, 这有待进一步研究。

目前对硅藻胞外多聚物的合成机制还不是很清楚。作者在研究中观察到, 在柄形成的过程中, 细胞色素体内分布有许多不规则的小泡, 这些小泡运动活跃, 形状和大小也不断地变化, 而在柄形成后, 这些小泡则消失, 推测这些小泡可能与胞外多聚物的合成直接相关。Herth (1979) 在研究中心硅藻  $\beta$ -几丁质纤维形成的过程中发

现, 一些含有纤维的小泡移动到靠近胞外多聚物分泌的质膜部位, 然后质膜再嵌入到分泌部位, 小泡与质膜融合到一起, 释放出纤维状物质。Sicko-Goad 等 (1989) 在研究羽纹硅藻胞外多聚物合成时, 在细胞质中也发现了几种小泡, 他们认为这些小泡可能代表了胞外多聚物转运和释放所处的不同过程。也有一些研究发现, 胞外多聚物首先以位于高尔基体成熟面一端的包含于小泡的细纤维出现 (Blun *et al.* 1981; Edgar 1983; Schmid 1988)。

本研究结果表明, 三种除草剂对硅藻胞外多聚物的生产均具有抑制作用, 其中以丁草胺最为明显。除草剂对胞外多聚物生产的影响与其浓度有关, 当除草剂浓度为  $10 \times 10^{-6}$  时, 对单细胞的形成和球状体的分泌未产生影响, 但大部分细胞柄的生产 (胞外多聚物分泌的 III 期) 受到抑制, 部分细胞的分裂 (IV 期) 受到影响, 当除草剂浓度达到  $30 \times 10^{-6}$  时, 绝大部分细胞球状体 (II 期) 的分泌受到抑制, 部分细胞柄的生产 (III 期) 受到抑制; 随着除草剂浓度进一步增加时, 群体不能散开形成单细胞 (I 期), 甚至导致细胞死亡。根据 Wang 等 (1997) 对长柄曲壳藻的研究表明, 除草剂 DCB (2, 6-dichlorobenzonitrile) 及其类似衍生物抑制了长柄曲壳藻非纤维胞外多聚物合成, 特别是细胞运动和柄的生产。  $10 \mu\text{mol/L}$  DCB 即影响胞

外多聚物的生产, 当 DCB 浓度在 10—150 $\mu$ mol/L 时, 细胞运动和胞外多聚物柄的生产受到明显抑制, 当细胞长期维持在 150 $\mu$ mol/L DCB 中时, 细胞不能生产胞外多聚物, 但当移去 DCB 时, 细胞即恢复运动和胞外多聚物的生产, 柄的长度与未加 DCB 的细胞柄的长度基本一致。除草剂抑制胞外多聚物生产的机制还不是很清楚。W ang 等 (1997) 认为, 胞外多聚物的合成依赖于细胞的运动和柄的形成, 胞外多糖附着物的生产是 *A. longipes* 发育生态学的一个重要组成, 在这个过程中, 细胞从群体分散形成单细胞和细胞附着到基底上一样重要。其他一些学者的研究也表明, 硅藻胞外多聚物质 (胶质) 的跨膜 (PM) 合成与其壳缝—运动关联机制密切相关 (Edgar *et al* 1984 Pickett-H eaps *et al* 1991)。硅藻运动能力来自于壳缝液体形成的毛细管张力, 或膜介导的细胞骨架与分泌的胶质链间的相互作用, 硅藻分泌的多糖形成的柄和几丁质纤维则来自于与质膜相关的结构 (Hoagland *et al* 1993)。除草剂, 如 DCB 及其类似物可能抑制了硅藻细胞的运动能力和柄的生成, 从而抑制了胞外非纤维素多糖的合成。W ang 等 (1997) 的结果还进一步表明, 除草剂 DCB 抑制位点在细胞内, 并认为除草剂 DCB 在长柄曲壳藻胞外非纤维素多糖合成途径的后阶段产生作用。本研究结果也证明了上述观点, 低浓度除草剂抑制了胞外多聚物合成的后期 (III 或 IV 期), 而高浓度则作用于胞外多聚物合成的前期 (I 或 II 期), 如单细胞的形成和细胞运动。此外, 研究中还发现, 经除草剂处理的细胞其色素体内观察不到活跃的小泡, 除草剂可能抑制了这些小泡的合成或合成这些小泡的细胞器, 从而抑制胞外多聚物的合成。

总之, 本研究结果表明, 胞外多聚物在硅藻生命活动中占有重要的作用, 直接影响到细胞的生长、繁殖和群体的形成。胞外多聚物的分泌与细胞的运动有关, 细胞内的一些细胞器 (如小泡等) 直接参与了胞外多聚物的合成。除草剂抑制了单细胞的形成和细胞的运动, 影响了细胞内参与胞外多聚物生产的细胞器 (如囊泡) 的合成, 从而抑制胞外多聚物的生产。

### 参 考 文 献

王大志, 黄世玉, 程兆第, 2003 营养盐水平对四种浮游硅藻胞外多糖产量的影响. 台湾海峡, 22(4): 487—492

- 王大志, 黄世玉, 程兆第, 2004a 光暗周期对三种硅藻胞外多糖生产的影响. 厦门大学学报 (自然科学版), 43(2): 244—248
- 王大志, 黄世玉, 程兆第, 2004b 三种海洋硅藻胞外多聚物形态、微细结构及组成的初步研究. 海洋与湖沼, 35(3): 273—278
- 金德祥, 程兆第, 林均民等, 1982 中国海洋底栖硅藻 (上卷). 北京: 海洋出版社, 1—323
- 金德祥, 程兆第, 刘师成等, 1991 中国海洋底栖硅藻 (下卷). 北京: 海洋出版社, 1—437
- 黄宗国, 蔡如星, 1984 海洋污损生物及其防除 (上卷). 北京: 海洋出版社, 1—352
- 程兆第, 高亚辉, 刘师成, 1995 福建沿岸微型硅藻. 北京: 海洋出版社, 1—90
- Alberte R S, Snyder S, Zahuranec B J *et al* 1992 Biofouling research needs for the United States Navy program history and goals *Biofouling* 6: 91—95
- Blum G W, Evans L V, 1981 Microscopical observations on *Achnanthes subessilis* with particular reference to stalk formation. *Bot Mar* 24: 193—199
- Edgar L A, 1983 The mechanism of diatom locomotion. I An ultrastructure study of the motility apparatus. *Proc R Soc Lond B*, 218: 345—348
- Edgar L A, Pickett-H eaps J D, 1984 Diatom Locomotion. In: Round F E, Chapman D J ed *Progress in Phycological Research*, Vol 3 Biopress, Bristol U K, 47—88
- Goto N, Kawamura T, Mitamura O *et al* 1999 Importance of extracellular organic carbon production in the total primary production by tilted-flat diatoms in comparison to phytoplankton. *Mari Ecol Prog Ser* 190: 289—295
- Herth W, 1979 The site of  $\beta$ -chitin fibril formation in centric diatom. II The chitin-forming cytoplasmic structures. *J Ultrastruct Res* 68: 16—27
- Hoagland K D, Rosowski J R, Gertz M R *et al* 1993 Diatom extracellular polymeric substances: Function, fine structure, chemistry, and physiology. *J Phycol* 29: 537—566
- Lignell R, 1990 Algal exudation and its relation to bacterial production during vernal phytoplankton blooms. *Arch Hydrobiol Beih* 34: 53—59
- Pickett-H eaps J, Hill D R A, Blake K L, 1991 Active gliding motility in an anaphid marine diatom, *Ardissonea* (formerly *Synedra*) *crystallina*. *J Phycol* 27: 718—725
- Schmid A-M M, 1988 The special Golgi-ER-mitochondrion unit in the diatom genus *Coscinodiscus*. *Pl Syst Evol* 158: 211—223
- Sisko-Goad L, Kocielek J P, Stoemer E F, 1989 Patterns of mucilage production and secretion in pennate diatoms. *Proc 47th Ann Meet Electron Microsc Soc Am*, 1016—1017
- Smith D C, Steward G F, Long R A *et al* 1995 Bacterial media-

- tion of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Res Part II* 42(1): 75—97
- Wang Y, Lu J J Mollet Jean-Claude *et al.* 1997. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). *Plant Physiol* 113: 1071—1080
- Wustman B A, Gertz M R, Hoagland K D. 1997. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). II. A model of adhesives based on chemical characterization and localization of polysaccharides from the marine diatom *Achnanthes longipes*. *Plant Physiology* 113: 1059—1069

## SECRETION PROCESS OF EXTRACELLULAR POLYMERS IN *ACHNANTHES JAVANICA* VAR MEISTER AND THE IMPACT BY HERBICIDE

HUANG Shi-Yu WANG Da-Zhi

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021)

(State Key Lab of Marine Environmental Science / Environmental Science Research Center, Xiamen University,  
Xiamen, 361005)

**Abstract** *Achnanthes* spp. is a prominent member of fouling communities in marine environments, which produces long extracellular polymeric substances (EPSs)—stalks and attaches to the surfaces of various substrates. This study investigated the secretion process by *Achnanthes javanica* var. Meister isolated from coastal waters of Xiamen, using micro-plate culture method, and the impacts of three herbicides on the secretion process were also investigated. The results showed that the secretion process could be divided into four phases. The first phase is single cell formation and cell reorientation phase, which started after 4—5h of inoculation of cells. Single cell separated from a filamentous colony and moved till a suitable position was found. The second phase is spherical pad formation, the cell motility stopped 2 to 3 h after the cell attached to the bottom. A small globular structure (pad) was produced in one side of the cell surface. The third phase is stalk elongation and collar-shaped structure formation, a highly structured stalk was formed and elongated 10 to 12h after the inoculation. Meanwhile, a collar structure also formed near the valve. The last phase is cell division and multiplication. Cells were multiplied successively and formed a filamentous colony or a stack of cells 12h after the inoculation.

The impacts of herbicides on the secretion process depend on herbicide's concentrations. At  $10 \times 10^{-6}$ , the formation of single cell was not affected and majority of cells could move, but the secretion was constrained and the length of the stalk was shortened significantly. 60% of the cells produced extracellular polymers and about 12% of them were with long stalks. Cell division was constrained in some cells. At concentration of  $30 \times 10^{-6}$ , formation of single cell kept going but motility was inhibited in most cells, and the secretion of globular structure (pad) was inhibited in 60% of total cells. Stalks formation and cell division were completely stopped. At higher herbicide concentration of  $80 \times 10^{-6}$ , formation of single cell was ceased and some cells were dead. The results demonstrate that the secretion of EPSs is a fast and essential biological process in *A. javanica* var. Meister, which depends on cell motility. Some organelles such as vesicles in cytoplasm may involve in EPS biosynthesis. The herbicides inhibit single cell formation and cell motility, influence organelle synthesis and their functions, which results in inhibition of EPS secretion.

**Key words** *Achnanthes javanica* var. Meister, Extracellular polymeric substances (EPSs), Secretion process, Herbicide