

小球藻与褐潮原因种——抑食金球藻间的相互作用研究*

毕相东^{1,4} 张兴华² 宋伦³ 胡顺鑫² 唐学玺^{2①} 闫冉¹

(1. 天津农学院水产学院 天津市水产生态及养殖重点实验室 天津 300384; 2. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003;
3. 辽宁省海洋水产科学研究院 大连 116023; 4. 南开大学环境科学与工程学院 天津 300350)

摘要 近年来渤海海域频繁暴发以抑食金球藻(*Aureococcus anophagefferens*)为主的褐潮对海水贝类养殖造成巨大的危害。筛选出既能强烈抑制抑食金球藻生长又可为养殖微环境中贝类提供饵料的微藻,并将其浓缩液缓释于贝类养殖的微环境中,将对降低褐潮的危害,提高养殖经济效益具有重要的实际应用价值。本实验以小球藻(*Chlorella vulgaris*)和抑食金球藻为实验材料,采用荧光定量 PCR 技术监测抑食金球藻的细胞密度,研究了抑食金球藻在单培养体系中的生长情况、与小球藻共培养时两种微藻生长情况的变化以及小球藻培养滤液对其生长和叶绿素荧光参数的影响。研究结果表明: (1) 在单培养体系中,抑食金球藻的生长曲线可用逻辑斯蒂增长模型拟合,随着起始密度的增加,环境容量(K)逐渐减小;而抑食金球藻的种群瞬间增长率(r)、进入拐点时间及稳定期细胞密度均较为接近; (2) 当小球藻与抑食金球藻以不同起始密度比共同培养时,抑食金球藻的生长均受到了显著地抑制($P<0.05$),且随着小球藻比例的升高抑制作用加强; (3) 滤液培养实验发现, $\geq 10\text{ mL}$ 小球藻培养滤液的加入可对抑食金球藻的生长和叶绿素荧光参数产生显著的影响($P<0.05$),生长速度减缓或滞长,叶绿素荧光参数 F_v/F_m 、 Φ_{PSII} 、 α 的值降低, I_k 的值增加, $PSII$ 受到损害,随着滤液加入量的增加,损害程度加深,并且不可恢复。

关键词 抑食金球藻; 褐潮; 小球藻; 贝类养殖; 相互作用; 叶绿素荧光

中图分类号 Q948.8 **doi:** 10.11693/hyhz20151000257

自 2009 年起已连续 5 年在河北省秦皇岛近岸海域定期(5—8 月)暴发“褐色赤潮”(国家海洋局, 2010—2014), 2011 年起山东半岛威海海域亦有“褐色赤潮”暴发(刘爱英等, 2013)。秦皇岛近岸海域乃至我国北方其它沿海暴发如此大范围的“褐色赤潮”对我国贝类养殖业造成极大的损失。渤海秦皇岛近岸海域是我国最大的海湾扇贝养殖区, 2009 年褐色赤潮暴发期间当地近 2/3 的海湾扇贝养殖区约 1733 hm^2 养殖贝类受到影响, 扇贝出现了生长停滞和死亡的现象(廖

洋等, 2012)。根据国家海洋局海洋灾害公报报道, 2010 年河北沿海“赤潮”(现已证实为主要为褐潮)面积达 3350 km^2 , 直接经济损失 2.05 亿元(国家海洋局, 2010—2014)。该褐色赤潮每年 5 月中下旬至 6 月上旬在渤海海域定期出现, 海水透明度降低常呈黄褐色, 形成的藻华一般到 8 月中下旬才会慢慢消去, 主要原因种是细胞直径只有 $2\text{—}3\text{ }\mu\text{m}$ 的微微型藻, 藻华发生时该藻细胞密度最高可达到 10^9 cell/L (Kong *et al.*, 2012)。中国科学院海洋研究所于仁成研究团队采用

* 国家自然科学基金青年项目, 31300393 号; 辽宁省自然科学基金资助项目, 2014020182 号; 天津市科技支撑重点项目, 15ZCZDNC00230 号; 中国博士后科学基金特别资助, 2015T80212 号; 天津市优秀科技特派员科研专项项目, 15JCTPJC56000 号; 辽宁省海洋与渔业科研计划项目, 201415 号。毕相东, 副教授, 硕导, E-mail: yl801123@aliyun.com; 同等贡献第一作者: 张兴华, 硕士研究生, E-mail: lglzmh@163.com

通讯作者: 唐学玺, 教授, 博士生导师, E-mail: tangxx@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-10-11, 收修改稿日期: 2016-01-12

光合色素分析和特异性抗体检测等手段研究表明, 渤海近岸海域有害藻华的主要原因种为海金藻类的抑食金球藻(*Aureococcus anophagefferens*) (Kong *et al.*, 2012)。抑食金球藻能产生一种类似多巴胺的生物活性物质(Sieburth *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 2012), 能抑制贝类侧纤毛的活动, 从而对滤食性贝类产生负面影响, 具体表现为抑制贝类的摄食、生长、甚至导致死亡(Bricelj *et al.*, 1997; Bricelj *et al.*, 2001)。因藻华期间细胞密度极高、能特异性地抑制贝类摄食、藻华水体呈黄褐色而被称作“褐潮”, 该命名已被国际有害藻华研究界所接受。至此, 我国是继美国(Cosper *et al.*, 1987)及南非(Probyn *et al.*, 2001)后第三个发生褐潮的国家。

目前, 褐潮的危害在我国近岸海域不断地扩大发展, 亟需建立有效的褐潮应急处置技术, 以期大幅降低其对近岸贝类养殖的危害。研究人员尝试采用粘土吸附藻细胞等物理方式(张雅琪等, 2013)及 H_2O_2 抑杀藻细胞等化学方法进行消除(Randhawa *et al.*, 2012)。但终因耗费高、生态安全性低等诸多局限, 均未规模化地应用于贝类养殖海域的褐潮应急处置中。最近兴起的利用植物间竞争作用或化感作用抑制有害藻类生长的生物控藻技术颇受关注, 被认为是高效、生态安全性好的新型控藻技术(杨小茹等, 2008)。毕相东等(2016)研发出一种饵料微藻浓缩液缓释仪, 使用筛选出的既能强烈抑制抑食金球藻生长又能为养殖微环境中贝类提供饵料的微藻, 并将其浓缩液缓释于贝类养殖的微环境中。该技术将能够有效降低对褐潮对贝类养殖的危害, 提高养殖经济效益, 具有广阔的实用推广前景。

小球藻(*Chlorella vulgaris*)是最为常见的贝类饵料微藻, 具有生长快、细胞活性高、竞争力强等特点。研究发现共培养体系中的小球藻对赤潮异湾藻(*Heterosigma akashiwo*)的生长具有强烈的抑制作用(王金凤, 2007)。本研究采用抑食金球藻的荧光定量 PCR 监测技术(宋林生等, 2013), 详细分析了共培养体系中小球藻与抑食金球藻的相互作用, 并在此基础上通过分析小球藻培养滤液对抑食金球藻生长和叶绿素荧光参数的影响, 探讨小球藻与抑食金球藻间的相互作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验藻种

抑食金球藻(*Aureococcus anophagefferens* CCMP1984)

来自美国国家海洋浮游植物藻种中心(National Center for Marine Algae and Microbiota, NCMA), 小球藻(*Chlorella vulgaris*)来自中国海洋大学生态学实验室藻种库。

1.2 培养条件

实验用三角瓶预先用 1mol/L 的 HCl 浸泡 24h, 蒸馏水反复冲洗干净后, 于 121°C 灭菌 20min。培养用的海水均为取自青岛市鲁迅公园的自然海水, 经沉淀、脱脂棉过滤、0.22 μ m 微孔滤膜抽滤后, 于 121°C 灭菌 20min。本实验均采用一次性培养的方法, 在 250mL 的三角瓶中进行, 培养液体积为 150mL。所有实验藻种均用 *f/2* 营养盐配方培养, 温度(20 $\pm$ 1)°C, 光照 60 μ mol/(m²·s), 光暗周期 12h : 12h, 每天摇动藻液 3—4 次, 防止藻细胞附壁下沉。

1.3 藻细胞的计数方法

小球藻和单养培养体系中抑食金球藻的计数方法: 取摇晃均匀的微藻培养液 0.5mL, 用 Lugol 碘液固定后血球计数板计数。

共培养体系中抑食金球藻的计数方法: 由于抑食金球藻细胞微小直径只有 2—3 μ m, 在共同培养体系中显微计数易受其它藻种和杂质的影响而导致计数失准。因此, 本实验中共同培养体系中抑食金球藻采用宋林生等(2013)研发的荧光定量 PCR 技术进行计数。该方法原理为利用抑食金球藻基因组中具有较高特异性的单拷贝基因脲基甲酸酯水解酶基因, 以该基因的序列设计特异性的引物和探针, 利用荧光定量 PCR 技术建立一种快速检测抑食金球藻细胞密度的方法。本研究参照该方法, 绘制藻细胞数量与 C_t 值的标准曲线和方程。然后, 实验中每 2 天取 1mL 藻液, 经 0.45 μ m 的纤维素滤膜过滤来获取藻细胞, 收集藻液的 0.45 μ m 的滤膜作为提取 DNA 的介质。将提取的 DNA 样品进行荧光定量 PCR, 获得 C_t 值, 将其代入已建立的标准曲线方程中并换算出藻细胞数量。每个样品设 3 个平行, 计算平均值。

1.4 叶绿素荧光参数的测定

用德国 Walz 公司产 Phyto-PAM 进行各叶绿素荧光参数的测定。取 2 mL 藻液经 15 min 暗适应后, 打开测量光, 待 F_t 荧光稳定后, 施加 200 ms 的饱和脉冲, 得到 F_0 、 F_m 及 F_v/F_m 的值。另取 2mL 藻液, 施加 164 μ mol/(m² s)的光化光 2 min 后, 施加 200 ms 的饱和脉冲, 得到 F' 、 F'_m 及 $\Phi PSII$ 的值。

另取 2 mL 藻液, 测定快速光曲线(RLC)(Ralph *et al.*, 2005)。光强梯度设置为: 1, 16, 32, 64, 164, 264,

364, 464, 664, 864, 1064, 1264, 1464, 1664, 1864 和 2064 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$, 通过软件内置公式拟合, 得到 α (到达光饱和之前 RLC 的初始斜率)、 $r\text{ETR}_{\text{max}}$ (最大相对电子传递速率)和 I_k (半饱和光强)的估计值。

1.5 实验内容

1.5.1 抑食金球藻荧光定量 PCR 监测技术的建立

(1) 藻细胞的收集及基因组 DNA 提取: 在光学显微镜下记录稳定期藻细胞密度后稀释, 使藻细胞密度最终分别达到为 $8, 8 \times 10^1, 8 \times 10^2, 8 \times 10^3, 8 \times 10^4, 8 \times 10^5, 8 \times 10^6 \text{ cell/mL}$, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤来获取微藻细胞, 收集藻液的 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜作为基因组 DNA 提取介质。藻细胞基因组 DNA 提取所用的试剂盒为 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0。提取流程按照试剂盒说明进行。

(2) 特异性荧光探针定量 PCR 反应(宋林生等, 2013)

上游引物 5'-GCGGAGGTCGTGGAGAGG-3'

下游引物 5'-GGGTGCGTCCGTAGACTTGA-3'

探针 5'-CTCGGCTTCACGGGCGGCTTCC-3'

反应体系: 基因组 DNA 模板约 $4 \mu\text{L}$ 、 $2 \times \text{Premix EX Taq Buffer Mix}$ (TaKaRa) $5 \mu\text{L}$ 、探针 $0.4 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{mol/L}$)、引物各 $0.2 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{mol/L}$)、最后加灭菌去离子水至 $10 \mu\text{L}$ 。

反应条件: 95°C 预变性 10 min , 95°C 变性 15 s , 60°C 退火/延伸 1 min , 40 个循环。

藻细胞基因组 DNA 样品在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行扩增和数据分析。

(3) 绘制标准曲线

将特异性荧光探针定量 PCR 反应所得的 C_t 值与细胞的对数值通过线性回归拟合形成标准曲线, 并得到标准曲线方程。

1.5.2 抑食金球藻的单培养实验 将处于指数增长期的抑食金球藻接进行接种, 使其起始密度分别达到 $(1, 2, 4) \times 10^4 \text{ cell/mL}$, 在藻种室培养。每实验设 3 个平行组, 每 d 取出藻液按 1.3 中所述方法对藻细胞进行计数。

1.5.3 小球藻和抑食金球藻的共培养实验 小球藻(*C. vulgaris*)简称 C、抑食金球藻(*A. anophagefferens*)简称 A, 具体设置如下: 处理①: 共培养体系中小球藻的起始密度为 $1 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 、抑食金球藻的起始密度为 $4 \times 10^4 \text{ cell/mL}$, 初始密度比 C : A = 1 : 4。处理②: 共培养体系中小球藻的起始密度为 $2 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 、抑食金球藻的起始密度为 $2 \times 10^4 \text{ cell/mL}$, 初始密度比

C : A = 1 : 1。处理③: 共培养体系中小球藻的起始密度为 $4 \times 10^4 \text{ cell/mL}$, 抑食金球藻的起始密度为 $1 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 、初始密度比 C : A = 4 : 1。

将处于指数增长期的抑食金球藻和小球藻按上述接种比例共同培养(小球藻的比例逐渐增加), 实验以相同条件下单培养实验中的抑食金球藻作为对照, 每实验设 3 个平行。自接种之后起, 每 2 d 取出藻液按 1.3 中所述方法对两种藻细胞进行计数。

1.5.4 小球藻培养滤液对抑食金球藻生长及叶绿素荧光参数的影响实验 为初步研究小球藻对抑食金球藻生长抑制的作用机理, 开展了小球藻培养滤液对抑食金球藻生长及叶绿素荧光参数的影响研究。将处于对数增长期、起始密度为 $5 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 的小球藻进行培养, 使其达到最大环境容量; 溶液经 $0.22 \mu\text{m}$ 的醋酸纤维素滤膜抽滤, 该溶液即为小球藻的培养液滤液。实验分 6 组, 每组加入不同量的小球藻培养滤液, 具体设置为: 组① 140 mL 海水+ 0 mL 小球藻培养滤液; 组② 135 mL 海水+ 5 mL 小球藻培养滤液; 组③ 130 mL 海水+ 10 mL 小球藻培养滤液; 组④ 120 mL 海水+ 20 mL 小球藻培养滤液; 组⑤ 105 mL 海水+ 35 mL 小球藻培养滤液; 组⑥ 90 mL 海水+ 50 mL 小球藻培养滤液。以组①为空白对照, 每组设 3 个平行, 按比例加入 $f/2$ 营养盐后, 接入 10 mL 处于指数增长期的抑食金球藻, 最后的实验总体积均为 150 mL 。自接种之后起, 每天同一时间取出藻液, 按 1.3 中所述方法对抑食金球藻细胞进行计数, 按 1.4 中所描述的方法进行叶绿素荧光参数的测定。

1.6 数据分析

1.6.1 种群瞬时增长率、环境容量和生长曲线进入拐点时间的计算 利用 Logistic 方程对微藻种群的增长进行拟合, 并根据其积分形式 $N=K/(1+e^{(a-rt)})$ 用统计软件 SigmaPlot 12.5 进行非线性回归分析, 计算环境容量(K)和种群瞬时增长率(r), 式中 a 表示曲线对原点的相对位置, 其值取决于 N_0 , $N_0=K/(1+e^a)$, t 表示时间。根据公式 $T_p=a/r$ 计算藻类生长曲线到达拐点的时间。

1.6.2 统计分析 采用 Excel 2010 作图。采用 SPSS 17.0 进行单因子方差分析和多重比较。 $P < 0.05$ 被认为是在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。

2 结果与分析

2.1 荧光定量 PCR 标准曲线结果

从图 1 可以看出, 荧光定量 PCR 扩增曲线平滑, 扩增效果较好。根据藻细胞 DNA 模板 PCR 扩增后所

得的 C_t 值与藻细胞数目的对数值通过线性回归拟合形成如下标准曲线见图 2, 线性回归方程为 $y = -2.6711x + 42.134$, 相关系数(R^2)为 0.9519, 显示出良好的线性关系, 且有较宽藻细胞数目检测范围, 完全可适用于本实验中抑食金球藻细胞数目的定量分析。

2.2 单培养体系中抑食金球藻的生长情况

单培养体系中不同起始密度抑食金球藻的生长情况见图 3。从图 3 可以看出, 不同起始密度抑食金球藻的生长曲线均呈现出典型的 Logistic “S”型增长模式。以逻辑斯谛方程进行拟合, 各参数的估计值以及生长曲线达到拐点的时间见表 1。结果表明随着起始密度的增加, 抑食金球藻种群 K 值逐渐减小, 进入指数生长期和静止期的时间亦逐渐缩短, 而种群瞬时增长率(r)、进入拐点时间(T_p)及稳定期细胞密度均较为接近。

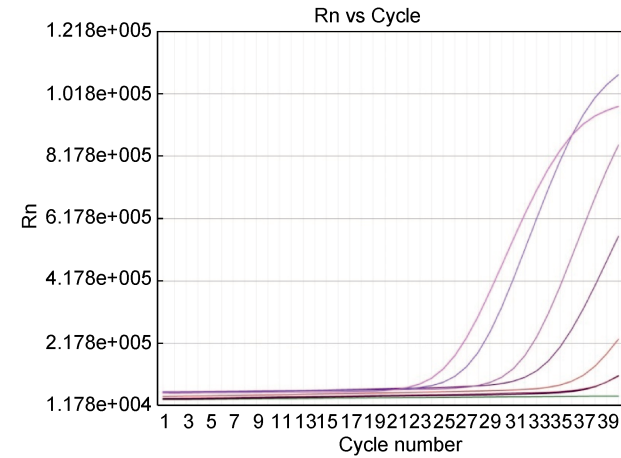


图 1 PCR 检测出荧光定量样品 ΔRn 和循环数的扩增曲线
Fig.1 Amplification of standards from qPCR run on ABI7500 of ΔRn versus the number of cycles

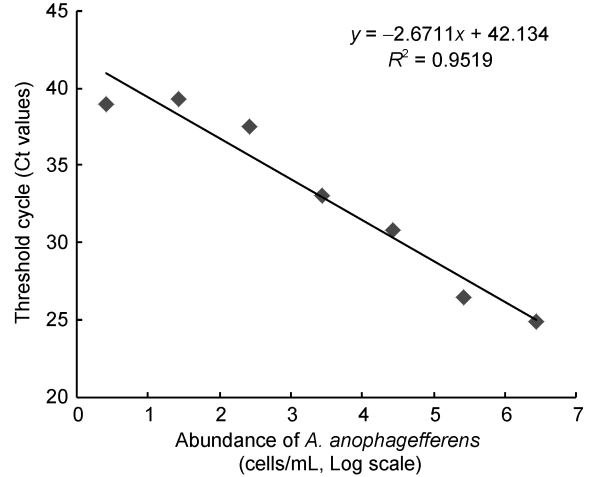


图 2 抑食金球藻密度对数值与 C_t 值的标准曲线
Fig.2 Standard curve of threshold cycle (C_t) versus the abundance of *A. anophagefferens* (cells/mL) in log scale

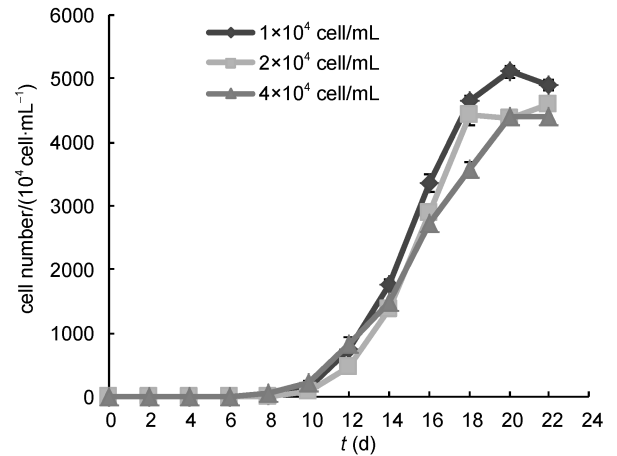


图 3 不同起始密度下抑食金球藻的生长曲线
Fig.3 The growth curve of *A. anophagefferens* under differential initial densities

表 1 不同起始密度下抑食金球藻的生长参数的比较

Tab.1 The growth parameters of *A. anophagefferens* population at different initial cell densities

种群生长参数	起始密度(cells/mL)		
	1×10^4	2×10^4	4×10^4
生长回归方程	$N=5128.9890/(1+e^{10.0498-0.6733t})$	$N=4667.2902/(1+e^{11.4526-0.7540t})$	$N=4643.8356/(1+e^{7.8168-0.5428t})$
R^2	0.9983	0.9952	0.9980
环境负载能力 K ($\times 10^4$ cells/mL)	5128.9890 ± 82.7617	4667.2902 ± 147.1753	4643.8356 ± 104.5826
A	10.0498 ± 0.9576	11.4526 ± 1.7340	7.8168 ± 0.7875
种群瞬时增长率(r)	0.6733 ± 0.0572	0.7540 ± 0.1026	0.5086 ± 0.0438
到达拐点时间 T_p (d)	14.9326 ± 0.1082	15.1884 ± 0.1625	15.3679 ± 0.1590
进入指数生长期的时间(d)	7	6	5
进入静止期的时间(d)	21	19	19

2.3 共培养实验两种藻细胞的生长比较

2.3.1 处理①中两种藻的生长比较 当 $C:A=1:4$

时, 小球藻和抑食金球藻的生长情况见图 4。小球藻从第 4 天起进入指数生长期, 在第 18 天时种群密度

达到 1775×10^4 cell/mL; 而抑食金球藻自接种起种群一直处于缓慢的增长状态, 一直未出现指数性的增长, 在第 16 天进入稳定期后细胞密度维持在 235×10^4 cell/mL, 仅为对照组 K 值的 4.58%。实验结束时共培养体系中抑食金球藻细胞数目与对照组相比有着显著性差异($P < 0.05$)。

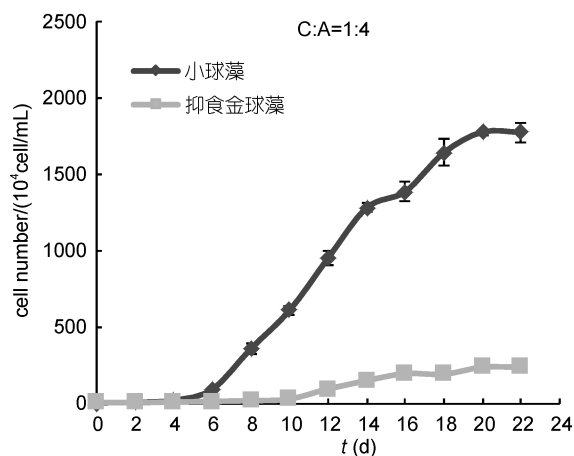


图 4 初始接种密度比 C:A=1:4 条件下小球藻和抑食金球藻的种群生长情况

Fig.4 The population growth of *C. vulgaris* and *A. anophageferens* when the initial density proportion C:A=1:4

2.3.2 处理②中两种藻的生长比较 当 C:A=1:1 时, 小球藻和抑食金球藻的生长情况见图 4。小球藻从第 3 天起进入指数生长期, 在第 18 天时种群密度达到 1923×10^4 cell/mL; 与小球藻相比抑食金球藻生长滞缓, 抑食金球藻的生长未出现明显的指数增长期和静止期。抑食金球藻的环境容量(K 值)为 160.667×10^4 cell/mL, 仅为对照组 K 值的 3.44%, 最后细胞密度维持在 90×10^4 cell/mL 左右。实验结束时共培养体系中抑食金球藻细胞数目与对照组相比有着显著的差异($P < 0.05$)。

2.3.3 处理③中两种藻的生长比较 在本处理组中, 抑食金球藻和小球藻的生长情况如图 6 所示。共培养体系中, 小球藻从第 2 天起进入指数生长期, 在第 18 天种群密度达到 2123.75×10^4 cell/mL, 生长未受到明显的影响。与小球藻相比, 共培养体系中抑食金球藻的生长受到了明显的抑制。抑食金球藻的生长未出现明显的指数增长期和静止期。环境容量(K 值)为 117×10^4 cell/mL, 仅约为对照组 K 值的 2.51%, 最后细胞密度维持在 80×10^4 cell/mL 左右。实验结束时共培养体系中抑食金球藻细胞数目与对照组相比有着显著的差异($P < 0.05$)。

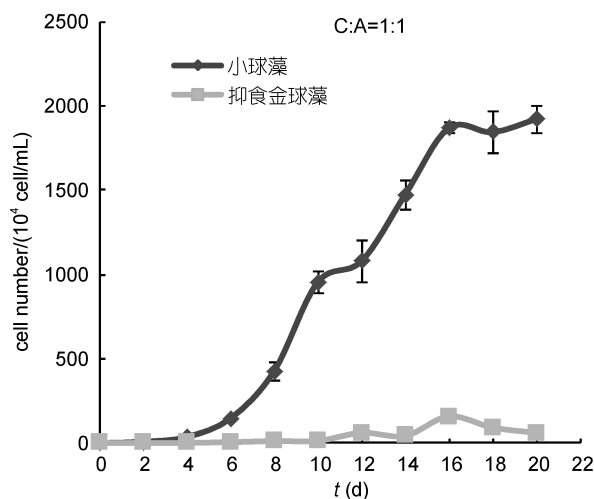


图 5 初始接种密度比 C:A=1:1 条件下小球藻和抑食金球藻的种群生长情况

Fig.5 The population growth of *C. vulgaris* and *A. anophageferens* when the initial density proportion C:A=1:1

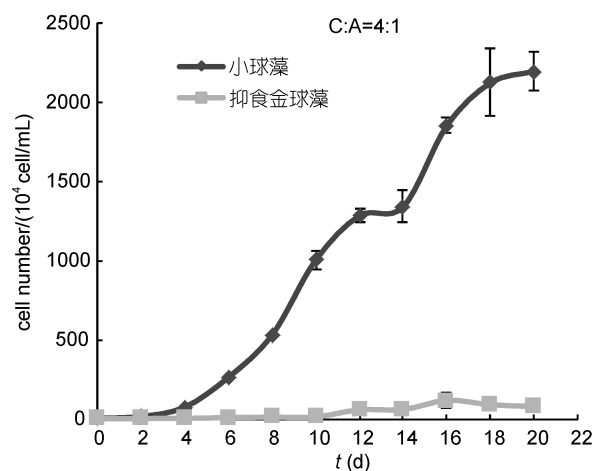
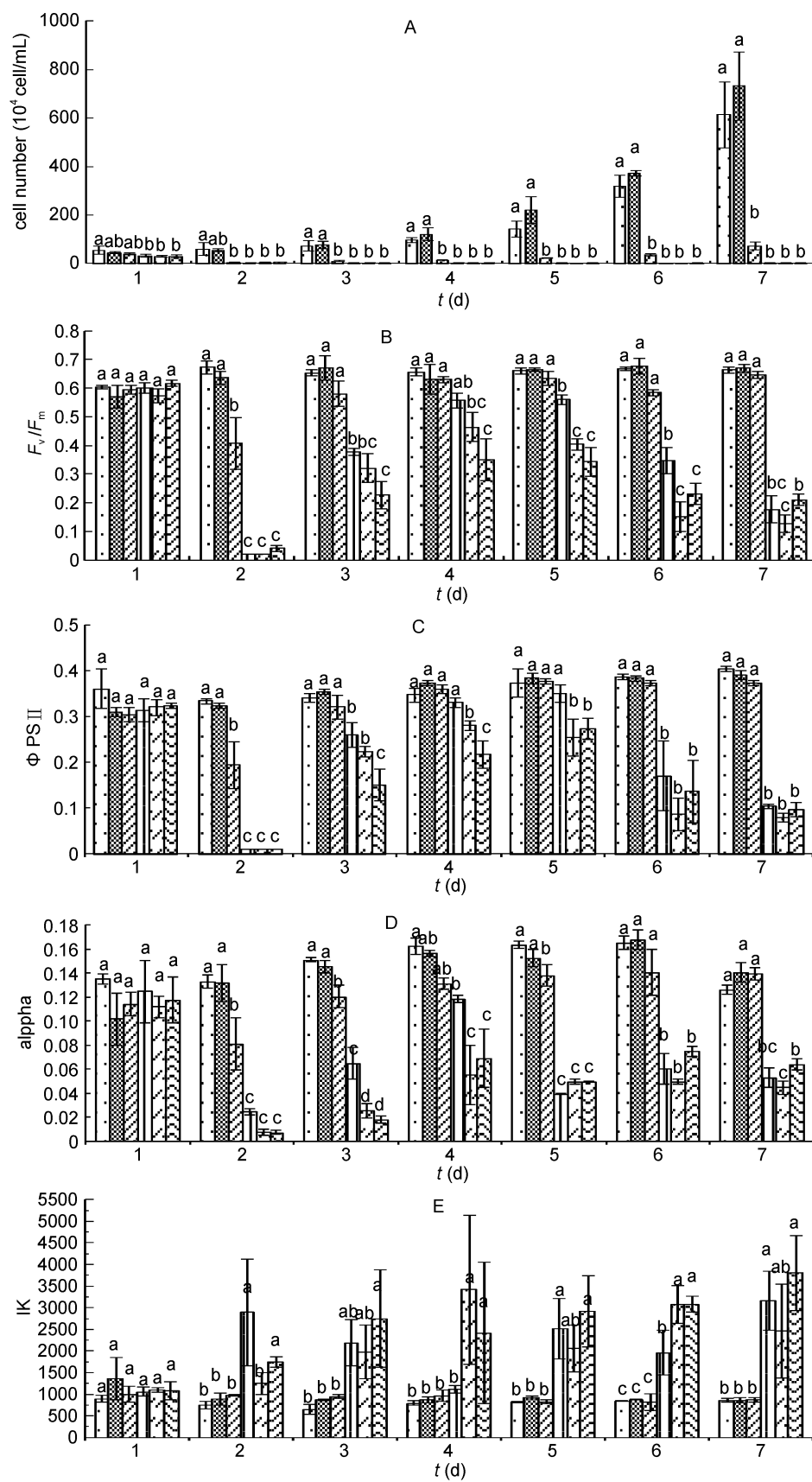


图 6 初始接种密度比 C:A=4:1 条件下小球藻和抑食金球藻的种群生长情况

Fig.6 The population growth of *C. vulgaris* and *A. anophageferens* when the initial density proportion C:A= 4:1

2.4 小球藻培养滤液对抑食金球藻的生长及叶绿素荧光参数的影响

2.4.1 小球藻培养滤液对抑食金球藻细胞密度的影响 加入不同量的小球藻培养滤液后对抑食金球藻细胞生长的影响见图 7(A)。加入 5mL 小球藻培养滤液(②组)对抑食金球藻的生长并未产生明显影响, 随着培养天数的增加, ①、②组细胞密度逐渐增加, 1—7 d 内与对照组(①)相比细胞密度均无显著性差异; 加入 10mL 小球藻培养滤液的③组细胞密度先减少后增加, 培养结束时细胞密度明显低于对照组, 细胞的生长受到了显著的抑制作用($P < 0.05$); 分别加入 20、



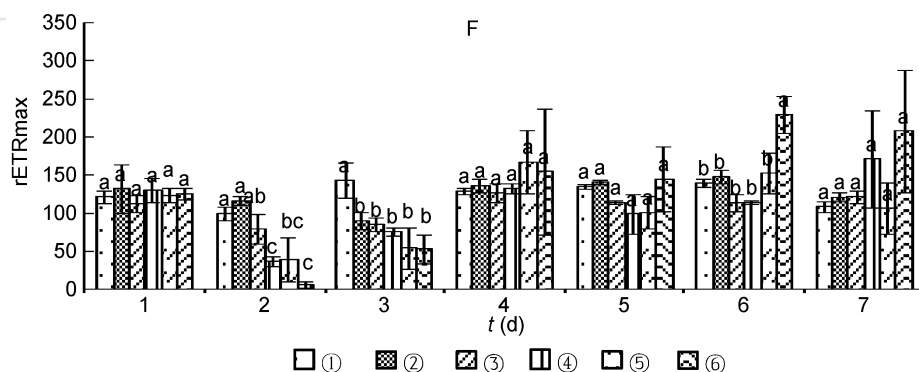


图 7 小球藻培养滤液对抑食金球藻的生长及叶绿素荧光参数的影响

Fig. 7 Effect of *C. vulgaris* culture medium filtrate on growth and fluorescence parameters of *A. anophageferens*

图例中数字分别代表的实验处理为: ① 140mL 海水+0mL 小球藻培养滤液+10mL 抑食金球藻藻液; ② 135mL 海水+5mL 小球藻培养滤液+10mL 抑食金球藻藻液; ③ 130mL 海水+10mL 小球藻培养滤液+10mL 抑食金球藻藻液; ④ 120mL 海水+20mL 小球藻培养滤液+10mL 抑食金球藻藻液; ⑤ 105mL 海水+35mL 小球藻培养滤液+10mL 抑食金球藻藻液; ⑥ 90mL 海水+50mL 小球藻培养滤液+10mL 抑食金球藻藻液

35、50 mL 小球藻培养滤液的④、⑤、⑥组细胞密度并未增加, 而是逐渐减少至较低水平($<5 \times 10^4$ cell/mL), 抑食金球藻的生长受到了明显的抑制($P < 0.05$), 培养结束时③、④、⑤、⑥组间细胞密度无显著性差异($P = 0.876$)。

2.4.2 小球藻培养滤液对抑食金球藻叶绿素荧光参数的影响 小球藻培养滤液对抑食金球藻叶绿素荧光参数的影响见图 7(B—F)。单因子方差分析结果显示: 第 1 天, 各组各叶绿素荧光参数与对照组(①)相比差异均无显著性差异; 第 2 天时, 小球藻培养滤液对抑食金球藻的影响凸显出来, ②组的各叶绿素荧光参数与对照无显著差异, 但④、⑤、⑥组的 F_v/F_m 、 $\Phi PS II$ 、 α 值下降剧烈, 几乎检测不到荧光信号, 与对照差异显著($P < 0.05$), ③组的 F_v/F_m 、 $\Phi PS II$ 、 α 值也显著低于对照组($P < 0.05$); 第 3—7 天, ②组的各叶绿素荧光参数与对照无显著差异, ③组的各荧光参数的值逐渐恢复, 培养结束时已与对照无显著性差异, 但④、⑤、⑥组的各参数变化剧烈, 其中 F_v/F_m 、 $\Phi PS II$ 、 α 值首次出现了不同程度的明显上升, 但持续 2 d 之后又跌落下来, Ik 值在高于对照组的范围内大幅波动、 $rETR_{max}$ 值亦上下波动。

3 讨论

3.1 单培养条件下抑食金球藻的生长状态

结合图 3 及表 1 发现, 不同起始密度对种群的生长有明显的影响, 随着起始密度的增加, 抑食金球藻的 K 值有逐渐降低的趋势, 董云伟等在研究赤潮常见原因种塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)单培养的生长状态时亦得到了相似的规律(董云伟等,

2004)。另外, 值得注意的是不同的起始密度下抑食金球藻种群在接种后 5d 内的生长都是非常缓慢的, 种群数量基本处于稳定状态, 而当种群密度一旦超过一定阈值, 会立即进入指数增长期, 并持续较长时间的快速增长, 如接种密度为 1×10^4 cell/mL 时, 种群从第 6 天的 2.8×10^4 cell/mL 迅速增加至第 14 天的 1770×10^4 cell/mL; 接种密度为 2×10^4 cell/mL 时, 种群从第 4 天的 2.77×10^4 cell/mL 迅速增加至第 14 天的 1370×10^4 cell/mL; 接种密度为 4×10^4 cell/mL 时, 种群从第 7 天的 4.2×10^4 cell/mL 迅速增加至第 15 天的 1475×10^4 cell/mL。指数增长的时间都持续了 9d 左右, 进入稳定期时都达到了较高的细胞密度(5000×10^4 cell/mL 左右)。

上述现象清晰地表明抑食金球藻具有藻细胞活性持续时间长、生长速度快、稳定期细胞密度高的特点, 这可能是抑食金球藻褐潮暴发后很难控制的原因之一(Gobler *et al*, 2004)。

3.2 共同培养条件下小球藻对抑食金球藻生长的影响

由图 4、图 5、图 6 可知两种藻以不同的比例共同培养, 小球藻都对抑食金球藻的生长产生了抑制作用, 与对照相比抑食金球藻的最大环境容量都明显下降。随着抑食金球藻细胞接种密度比由小到大, 相比于对照组的 K 值越来越小(占比分别为 4.58%、3.44%及 2.51%), 抑食金球藻生长受到的抑制作用亦越来越强。

3.3 小球藻培养滤液对抑食金球藻生长及叶绿素荧光参数的影响

实验结果显示: 加入 5 mL 的小球藻滤液不会对

抑食金球藻的生长产生影响,但当加入的量 ≥ 10 mL 就会对抑食金球藻的生长产生显著的抑制作用,加入的量 ≥ 20 mL 时抑食金球藻细胞数量不会再增加而是逐渐减少至 5×10^4 cell/mL 以下。潘克厚等(2007)将微藻种间竞争的机理主要分为资源竞争、化感作用和细胞接触。结合共培养实验和小球藻滤液培养实验结果,小球藻对抑食金球藻抑制作用应是通过化感作用实现的,即小球藻分泌的胞外产物中含有对抑食金球藻的生长具有强烈抑制作用的化感物质。

为深入探讨小球藻对抑食金球藻的化感抑藻机理,作者开展了小球藻培养液对抑食金球藻生长及叶绿素荧光参数的影响研究。 F_v/F_m 是 PS II 的最大光化学量子产量,反映 PS II 的最大光能转换效率,非胁迫条件下该参数的变化极小,胁迫条件下该参数明显下降。本实验结果显示加入 5 mL 以上的小球藻培养滤液的组别,接种后第 2 天抑食金球藻的 F_v/F_m 的值都出现了明显下降,这说明抑食金球藻的 PS II 已受到损害。其中加入 10 mL 的处理组,经过一定时间后可恢复至与对照无显著差异的水平,说明 PS II 受到的这种程度损伤可以恢复。但加入 20、35、50 mL 的处理组,经过一段时间也没有恢复到正常水平,并且细胞密度没有出现增长的趋势而是逐渐降低。因此,作者认为当加入的小球藻滤液超过一定量时,即可对抑食金球藻 PS II 造成不可恢复的损伤,进而造成抑制抑食金球藻的生长,直至死亡。

加入 5 mL 以上的小球藻培养滤液的组别,接种后第 2 天抑食金球藻 Φ PS II、Alpha 的值都出现了明显下降。 Φ PS II 是 PS II 实际光化学量子产量,它反映了 PS II 反应中心在有部分关闭情况下实际原初光能捕获效率。 Φ PS II 的降低说明小球藻滤液阻止抑食金球藻细胞同化力(NADPH, ATP)的形成,从而影响对碳的固定与同化,进而影响细胞的生长。Alpha 是快速光曲线的初始斜率,反映了植物对光能的捕获能力,Alpha 的降低说明藻细胞对光能的利用效率下降。 I_k 是最小饱和光强,与植物对强光的耐受能力有关, I_k 的上升说明小球藻滤液的加入可以在一定程度上增强抑食金球藻细胞对强光的耐受能力,但 I_k 值大幅波动也说明了藻细胞光系统处于不正常状态,不利于光合作用的正常进行,进而影响抑食金球藻的生长。

3.4 小球藻在褐潮应急处置中的应用前景

张雅琪等(2013)进行了改性黏土对褐潮种的去除研究,实验发现改性黏土对抑食金球藻的去除效

率普遍很低。Randhawa 等(2012)发现一定量的 H_2O_2 可有效去除高密度的抑食金球藻,但是费用比较昂贵。因此,目前国内外还没有能够有效应急处置褐潮的方法。本实验结果表明在共同培养体系中的小球藻及单培养的小球藻滤液对抑食金球藻均有着强烈的抑制作用,表明小球藻在近岸贝类养殖区褐潮危害的应急处置中具有极大的应用潜力。若将新鲜的小球藻浓缩液缓释于贝类养殖的微环境中,则既可抑制抑食金球藻的生长又可为养殖微环境中贝类提供饵料的微藻,这将对降低褐潮对养殖贝类的危害及提高养殖经济效益具有非常重要的实际应用价值。但上述研究均是在实验生态学条件下完成的,具有稳定的光照,营养盐和适宜的温度,且排除共栖异养细菌等诸多环境因子对微藻间相互作用的影响(Nakashima *et al*, 2006; Yu *et al*, 2006)。因此,若要将小球藻或小球藻化感物质规模化应用于贝类养殖海域褐潮危害的应急处置之前还需做进一步实践摸索。

4 结论

(1) 单培养体系中,抑食金球藻具有藻细胞活性持续时间长、生长速度快、稳定期细胞密度高(5×10^7 cell/mL)的特点,这可能是抑食金球藻褐潮暴发后很难控制的原因之一。

(2) 共培养实验中,小球藻对抑食金球藻生长具有强烈的抑制作用,且抑制作用随着小球藻所占比例的升高而增强;滤液实验中发现, ≥ 10 mL 小球藻培养滤液的加入可对抑食金球藻的生长和叶绿素荧光参数产生显著的影响($P < 0.05$),生长速度减缓或滞长,叶绿素荧光参数 F_v/F_m 、 Φ PS II、alpha 的值降低, I_k 的值增加,PS II 受到损害,随着滤液加入量的增加,损害程度加深,并且不可恢复。

参 考 文 献

- 王金凤, 2007. 三种海洋经济微藻与赤潮异湾藻的竞争研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 24—25
- 毕相东, 王宏坡, 郭永军等, 2016. 一种饵料微藻浓缩液缓释仪: 中国, 201520754681. 2016-01-13
- 刘爱英, 宋秀凯, 秦华伟等, 2013. 2011 年烟台四十里湾微型金藻褐潮分析. 海洋湖沼通报, (3): 73—79
- 杨小茹, 苏建强, 郑天凌, 2008. 化感作用在赤潮调控中的意义及前景. 环境科学学报, 28(2): 219—226
- 宋林生, 邱丽梅, 刘 瑞等, 2013. 一种抑食金球藻的快速检测方法: 中国, 201310409553. 2013-12-25
- 张雅琪, 俞志明, 宋秀贤等, 2013. 改性黏土对褐潮生物种 *Aureococcus anophagefferens* 的去除研究. 海洋学报, 35(3): 197—203

- 国家海洋局. 2010—2014. 2009—2013 中国海洋灾害公报. 北京: 国家海洋局
- 董云伟, 董双林, 刘相义, 2004. 不同起始浓度对塔玛亚历山大藻和赤潮异弯藻种群竞争的影响. 中国海洋大学学报, 34(6): 964—968
- 廖 洋, 杨锡畅, 2012. 褐潮来袭: 危害大 待破解. 中国科学报, 2012-07-25(A1) 要闻
- 潘克厚, 王金凤, 朱葆华, 2007. 海洋微藻间竞争研究进展. 海洋科学, 31(5): 58—62
- Bricelj V M, Lonsdale D J, 1997. *Aureococcus anophagefferens*: Causes and ecological consequences of brown tides in U.S. mid-Atlantic coastal waters. Limnol Oceanogr, 42(5): 1023—1038
- Bricelj V, MacQuarrie S, Schaffner R, 2001. Differential effects of *Aureococcus anophagefferens* isolates (“brown tide”) in unialgal and mixed suspensions on bivalve feeding. Mar Biol, 139(4): 605—616
- Cosper E M, Dennison W C, Carpenter E J *et al*, 1987. Recurrent and persistent brown tide blooms perturb coastal marine ecosystem. Estuaries, 10(4): 284—290
- Gobler C J, Boneillo G E, Debenham C J *et al*, 2004. Nutrient limitation, organic matter cycling, and plankton dynamics during an *Aureococcus anophagefferens* bloom. Aquatic Microb Ecol, 35(1): 31—43
- Kong F Z, Yu R C, Zhang Q C *et al*, 2012. Pigment characterization for the 2011 bloom in Qinhuangdao implicated “brown tide” events in China. Chin J Oceanol Limnol, 30(3): 361—370
- Nakashima T, Miyazaki Y, Matsuyama Y *et al*, 2006. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium *γ-proteobacterium*. Appl Microbiol Biotechnol, 73(3): 684—690
- Probyn T, Pitcher G, Pienaar R, 2001. Brown tides and mariculture in Saldanha Bay, South Africa. Mar Pollut Bull, 42(5): 405—408
- Ralph P J, Gademann R, 2005. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. Aquatic Bot, 82(3): 222—237
- Randhawa V, Thakkar M, Wei L P, 2012. Applicability of hydrogen peroxide in brown tide control-culture and microcosm studies. PLoS One, 7(10): e47844
- Sieburth J M, Johnson P W, Hargraves P E, 1988. Ultrastructure and ecology of *Aureococcus anophagefferens* gen. et sp. nov. (Chrysophyceae): The dominant picoplankton during a bloom in Narragansett Bay, Rhode Island, summer 1985. Journal of Phycol, 24(3): 416—425
- Yu J, Tang X X, Tian J Y *et al*, 2006. Effects of elevated CO₂ on sensitivity of six species of algae and interspecific competition of three species of algae. J Environ Sci, 18(2): 353—358
- Zhang Q C, Qiu L M, Yu R C *et al*, 2012. Emergence of brown tides caused by *Aureococcus anophagefferens* Hargraves et Sieburth in China. Harmful Algae, 19: 117—124

INTERACTION BETWEEN *CHLORELLA VULGARIS* AND BROWN TIDE CAUSITIVE SPECIES *AUREOCOCCUS ANOPHAGEFFERENS* UNDER CONTROLLED LABORATORY CONDITIONS

BI Xiang-Dong^{1,4}, ZHANG Xing-Hua², SONG Lun³, HU Shun-Xin², TANG Xue-Xi², YAN Ran¹

(1. Department of Fisheries Sciences, Tianjin Agricultural University, Key Laboratory of Aqua-ecology and Aquaculture of Tianjin, Tianjin 300384, China; 2. College of Marine Life Science, Ocean university of China, Qingdao 266003, China; 3. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China; 4. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300350, China)

Abstract Brown tide broke out in recent years in the Bohai Sea, China, in which *Aureococcus anophagefferens* was found responsible. The brown tide severely damaged local shellfish culture. Application of bait-microalgae can strongly inhibit the proliferation of *A. anophagefferens* and provide food for shellfish in the microenvironment, and could mitigate the brown tide to save economic shellfish culture. We studied the interaction between *Chlorella vulgaris* and *A. anophagefferens*, and the impacts of *C. vulgaris* culture media filtrate on *A. anophagefferens* growth and on chlorophyll fluorescence under laboratory conditions, in which the number of *A. anophagefferens* was monitored by quantitative real-time PCR. Results show that in the mono-culture, the proliferation of *A. anophagefferens* followed the Logistic model, and its initial cell density affected significantly the environmental-carrying capacity (K) of algal populations; and K values decreased gradually with the increase of initial cell densities. However, *A. anophagefferens* of different initial cell densities were more or less similar to the instantaneous increase rate, the time at inflexion point, and algal cell density in stationary phase. In the co-culture, the growth of *A. anophagefferens* was inhibited significantly ($P < 0.05$) by *C. vulgaris* of different algal initial cell densities, and the inhibitory effect increased strongly with the increase of *C. vulgaris* proportion. In the filtrate cultivation experiment, we found that *C. vulgaris* filtrate at ≥ 10 mL could remarkably affect the growth and chlorophyll fluorescence of *A. anophagefferens* ($P < 0.05$). More specially, it slowed down the growth and damaged PS II (F_v/F_m , $\Phi_{PS II}$, and alpha values reduced, I_k values increased). More filtrate adding deepened the damage that tended to be irreversible.

Key words *Aureococcus anophagefferens*; brown tide; *Chlorella vulgaris*; interspecies competition; shellfish culture; chlorophyll fluorescence