

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*

王大志 黄世玉[†] 程兆第^{††}

(厦门大学海洋环境科学教育部重点实验室;厦门大学环境科学研究中心 厦门 361005)

[†](集美大学水产学院 厦门 361021)

^{††}(厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

提要 利用光镜和扫描电镜对厦门近海三种常见附着硅藻——爪哇曲壳藻亚缢变种 (*Achnanthes javanica* var. *subconstricta*)、咖啡形双眉藻 (*Amphora coffeaeformis*) 和多枝舟形藻 (*Navicula ramosissima*) 胞外多聚物 (Extracellular polymeric substances, EPSs) 的形态和微细结构进行了研究,并初步分析了其化学组成。结果表明, *A. javanica* var. *subconstricta* 的胞外多聚物为透明的长柄,分为领、柄及垫状物三部分,电镜显示其微细结构为由许多纤维组成的双层实心管; *Amphora coffeaeformis* 分泌的 EPS 为由串连的小节组成的实心管状结构,许多管交织成厚的胶质块; *Navicula ramosissima* 的 EPSs 则为透明的薄膜并形成胶质膜。三种硅藻胞外多聚物的水溶性和水不溶性的主要成分均为多糖类,达总量的 70% 以上,蛋白质含量次之,不含脂类物质,但不同藻类 EPS 的组成差异较大。此外,还探讨了 EPSs 的功能及其分泌机理。

关键词 海洋硅藻,胞外多聚物,形态,微细结构,化学组成

中图分类号 Q942

硅藻是海洋和淡水体系中物种丰富及个体丰度巨大的类群,它们的有机物生产率和光合作用速率可与陆地上的高等植物相媲美 (Kelly, 1989)。研究表明,许多硅藻,包括浮游和附着种类在其生长繁殖过程中均能生产分泌一种粘性物质,称为胞外多聚物 (Extracellular Polymeric Substances, EPSs),其形态和结构多样,组成复杂,是硅藻生命活动过程中不可或缺的部分 (Hoagland *et al.*, 1993)。近年来,随着海洋生态学的不断深入,硅藻胞外多聚物的研究引起了海洋学家的重视。已有的一些研究结果表明,硅藻胞外多聚物在水域食物网的物质循环和能量流动、菌-藻关系、EPS 在硅藻周围构建的微型生态环境的营养作用中都占有重要作用 (Riebesell, 1991; Smith *et al.*, 1995; Goto *et al.*, 1999)。此外,硅藻胞外多聚物还是污损生物学的一个重要研究领域 (黄宗国等, 1984; Hoagland *et al.*, 1993)。Hoagland 等

(1993)指出硅藻分泌的胞外多聚物在硅藻附着过程中起着重要的作用,直接关系到硅藻的正常生长、生物膜的形成、垂直结构和硅藻栖息地的稳定等。

在过去的半个多世纪中,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),但有关硅藻胞外多聚物方面的研究尚未有专门报道。作者对厦门海区 3 种常见附着硅藻的胞外多聚物形态和微细结构进行了研究,并对其化学组成进行了初步分析,以为阐明硅藻胞外多聚物的功能及污损硅藻的防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 硅藻分离及培养

实验用三种硅藻:爪哇曲壳藻亚缢变种 (*Achnanthes javanica* var. *subconstricta*)、咖啡形双

* 国家自然科学基金资助项目,39900020 号。王大志,博士,副教授, E-mail: dzwang@jingxian.xmu.edu.cn

收稿日期:2003-10-16,收修改稿日期:2003-12-07

眉藻 (*Amphora coffeaeformis*) 和多枝舟形藻 (*Navicula ramosissima*) 均采自厦门附近海域的大型海藻 (如石莼、浒苔等) 上。采集到这些大型海藻后, 在过滤海水中充分漂洗, 把含有硅藻的海水在解剖镜下分拣, 选出所需硅藻藻种, 置于 200ml 的三角瓶中, 加入约 100ml *f/2* 培养液培养。培养温度为 $(23 + 1)^\circ\text{C}$, 光照强度为 4000lx, 光暗周期为 12h: 12h。培养 4—5 天后, 在解剖镜下再次分拣出所需藻种, 静置培养。经 3—5 次纯化后, 经抗生素处理, 得到无菌纯藻种用于实验。

1.2 胞外多聚物 (EPS) 的形态及微细结构观察

藻类培养 4—5 天后, 取少量样品直接置于载玻片上制成标本, 在 ZEISS Axioskop 型光学显微镜下观察, 使用配置 MC80 显微镜用照相机拍摄。取少量样品于盖玻片上, 用少量 Milli-Q 水冲洗去盐分, 待其自然风干后直接喷金, 然后在 S-520 型扫描电镜下观察 EPS 的微细结构。

1.3 EPS 化学组成的提取和测定

EPS 的提取采用改进的 Wustman 等 (1997) 的方法。藻类培养一段时间后, 倒掉上层培养液并用消毒海水洗 3—5 次, 用毛笔将附着于瓶底的藻体刷出, 收集至 50ml 离心管中, 离心 5min (5000r/min), 弃上清液, 沉淀用 Milli-Q 水冲洗, 重复 3 次, 每次离心 5min。然后在沉淀中加入 90% 的酒精 10ml, 提取 10min, 离心 5min (5000r/min), 重复 3 次, 后再用 Milli-Q 水冲洗 3 次, 离心 5min (5000r/min)。沉淀在 90℃ 的蒸馏水中提取 1h, 离心 5min (5000r/min), 上清液即为 EPS 的水溶性组分 (Water Soluble-WS), 沉淀中加入 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液 10ml 在 95℃ 水浴 4—5h, 离心 5min (3000r/min), 上清液即为水不溶性组分 (Water Insoluble-WI), 将两种组分放在蒸馏水中透析 24h, 测定其组成。

糖类测定采用硫酸 - 苯酚法 (Dubois *et al.*, 1956), 蛋白质的测定采用 Lowry 等 (1951) 的方法, 脂类的测定则采用称重的方法 (Bligh *et al.*, 1959)。

2 结果

2.1 胞外多聚物 (EPS) 的形态和微细结构

2.1.1 爪哇曲壳藻亚缢变种 为福建沿岸常见种, 壳面长 37—70 μm , 宽 11—20 μm , 壳面两侧的中部缢缩, 以胶质柄营附着生活, 经风浪打散后过浮游生活 (金德祥等, 1982)。

自然状态下, *A. javanica* var. *subconstricta* 成簇生长, 以具有斧状足的一端黏附于基底或其他藻体上 (图 1-1)。光镜下观察, 可以看到在藻体凹陷壳面一侧有一条透明杆状物质, 长约 45 μm , 它一端与基底相连, 一端与藻体相连 (图 1-2)。图 1-3 为 SEM 下观察到的 *A. javanica* var. *subconstricta* 柄的微细结构, 分为颈部、柄部和垫状物 (斧状足) 等三个明显的部分。颈部与细胞壳面相连, 较细, 柄部则较为均一, 在与基底相连处膨大成垫片状 (斧状足)。整个柄部为相对致密的内核外包一层胶质薄管, 胶质管主要由许多细小纤维管组成 (图 1-4)。此外, 研究中还发现, *A. javanica* var. *subconstricta* 细胞可在多个位置分泌胞外多聚物。

2.1.2 多枝舟形藻 是一种生长十分迅速的藻种, 培养 3—5 天后, 藻细胞即覆盖整个培养基底, 并粘成一团。在光镜下观察, *N. ramosissima* 分泌的 EPS 为黏膜状并连成一片, 细胞黏附在膜状物表面 (图 1-5)。SEM 下观察到, *N. ramosissima* 分泌的 EPS 为透明黏膜, 其间分布有许多中空的膜状物, 形状与细胞壳面相似, 并可观察到清晰的点纹 (图 1-6, 1-7)。在壳面边缘或是藻体相互靠近的部位, EPS 的分泌量相对较多, 并且呈现散状分布, 在上部壳面分布的 EPS 则成膜状。

2.1.3 咖啡形双眉藻 该藻细胞呈椭圆形, 末端截形, 相连带有细弱点纹组成的纵列点条纹。其细胞壳面狭, 呈半月形 (金德祥等, 1982)。

在光镜下观察, *A. coffeaeformis* 的胞外多聚物为淡黄色的块状结构, 细胞包埋在胶质块中, 并沿着胶质管移动 (图 1-8)。SEM 下观察到 *A. coffeaeformis* 的胞外多聚物为细的管状结构, 胶质管一端连于藻体, 另一端与其他藻体分泌的胶质管相连 (图 1-9)。这种胶质管为实心结构, 并由串连的小节组成 (图 1-10)。许多管纵横交错形成胶质块, 胶质管比藻体的直径小得多。藻细胞沿着这些胶质管进行运动和群体克隆。

2.2 胞外多聚物 (EPS) 的化学组成

表 1 为三种硅藻胞外多聚物水溶性和水不溶性部分的化学组成。从表 1 中可以看到, 三种硅藻 EPS 的水溶性和水不溶性部分皆以多糖类为主, 达总量的 70% 以上, 蛋白质含量次之, 不含脂类物质。但不同种间 EPS 的组成差异较大, 特别是水不溶性部分: *A. coffeaeformis* 的 EPS 主要为多糖, 达总量的 97%, 蛋白质含量则较低, 而 *A. javanica* var. *subconstricta* 和 *N. ramosissima* 的

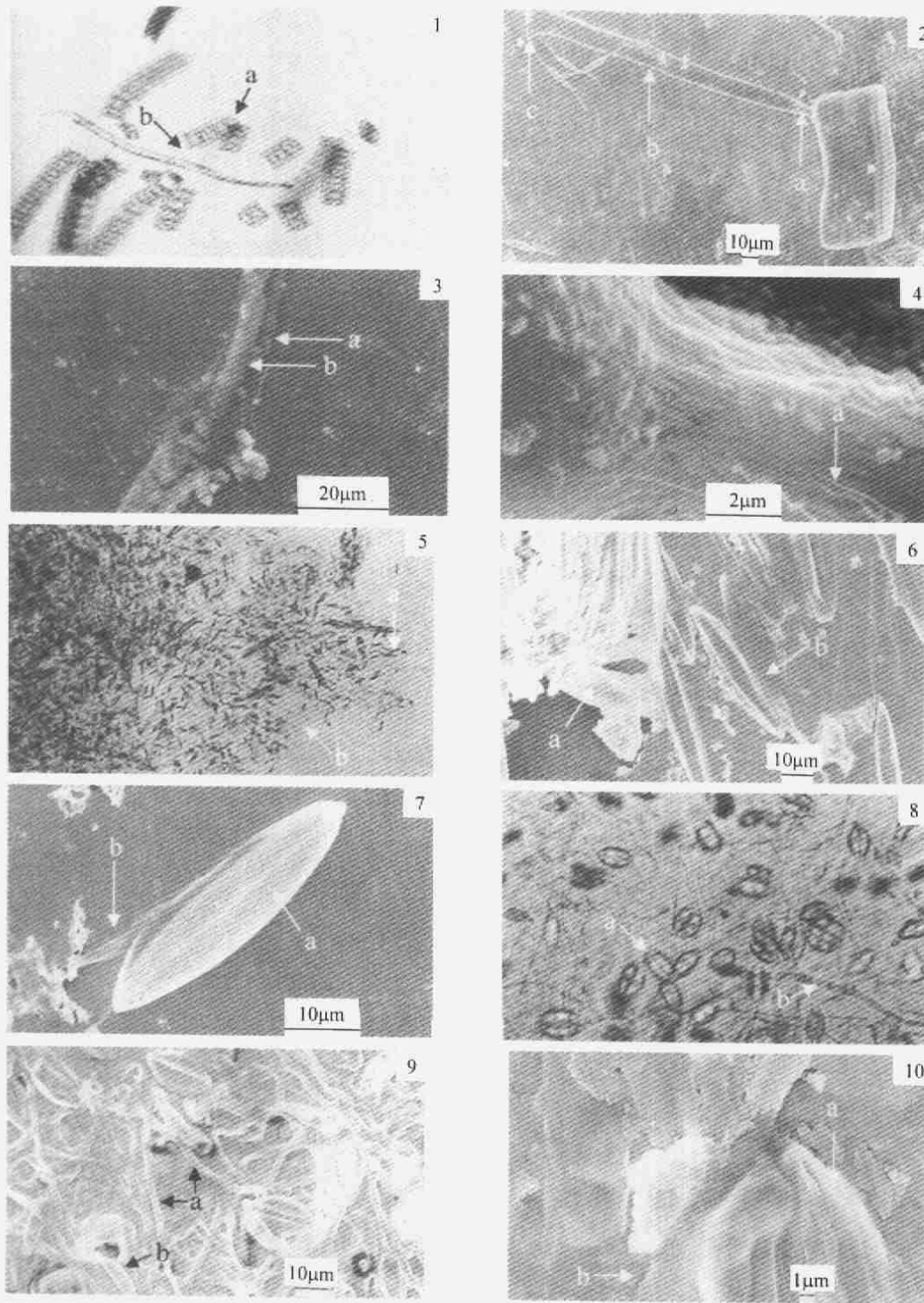


图 1 三种海洋硅藻胞外多聚物的形态和微细结构

Fig.1 Morphology and fine structure of EPSs in three marine diatom species

1—4 为 *A. javanica* var. *subconstricta*: 1. 细胞群体和管状多聚物 ($\times 200$), a. 藻细胞, b. 柄状胞外多聚物; 2. 柄的结构, a. 领, b. 柄部, c. 斧状足; 3. 柄的微细结构, a. 外管, b. 内管; 4. 柄的微细结构, a. 纤维管。5—7 为 *N. ramosissima*: 5. 细胞群体和膜状多聚物 ($\times 100$), a. 藻细胞, b. 膜状胞外多聚物; 6. 膜状胞外多聚物, a. 膜状多聚物, b. 细胞状胞外多聚物; 7. 分泌膜状多聚物的细胞, a. 藻细胞, b. 胞外多聚物。8—10 为 *A. coffeaeformis*: 8. 细胞群体和管状多聚物 ($\times 200$), a. 藻细胞, b. 管状多聚物; 9. 管状多聚物, a. 管状多聚物, b. 藻细胞; 10. a. 藻细胞, b. 管状多聚物

表 1 三种海洋硅藻胞外多聚物的化学组成(%)

Tab.1 Chemical compositions of EPSs in three marine diatom species (%)

海洋硅藻	水溶性			水不溶性		
	多糖	蛋白质	脂类	多糖	蛋白质	脂类
<i>A. javanica</i> var. <i>subconstricta</i>	83.2	16.8	—	81.4	18.6	—
<i>A. coffeaeformis</i>	88.2	11.8	—	96.8	3.2	—
<i>N. ramosissima</i>	91.3	8.7	—	72	28	—

注：“—”表示未检出

EPS 中的蛋白质含量则较高,分别为 18.6% 及 28%。

3 讨论

3.1 胞外多聚物(EPS)的形态及功能

研究表明,绝大多数硅藻都具有生产和分泌胞外多聚物的能力,这是硅藻生命活动过程中不可缺少的一部分(Hoagland *et al.*, 1993)。硅藻胞外多聚物的形态多样,主要以杆、管、顶垫、薄层黏膜及荚膜的形式出现在胞体外部,功能也较为复杂,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,此外在防止硅质壁的溶解及浮游动物的摄食等方面也有一定的作用(Hoagland *et al.*, 1993)。一些研究表明,底栖附着硅藻的 EPS 主要以固着和连接克隆的功能为主, EPS 大多位于胞体的同一侧,而油泥硅藻所分泌的 EPS 主要起到克隆生长和运动的作用,同时它也可以保护胞体免于被水流冲走,或是被小型底栖动物所摄食。本研究结果进一步表明,不同硅藻因生活习性的差异其分泌的 EPS 的形态和功能也各不相同:*A. javanica* var. *subconstricta* 主要营附着生活,细胞常连接成串,其分泌的胞外多聚物为柄状,一端连接在基底上,该结构有利于细胞的生长和固着;*A. coffeaeformis* 的 EPS 为实心管状,且许多管相连成胶质块,这种结构除对细胞有保护作用外,在藻细胞的运动中也有一定的作用,研究中也发现,藻细胞壳缝端紧贴在胶质管上并沿着胶质管移动;*N. ramosissima* 的 EPS 则为薄膜状,其功能主要起到克隆细胞、运动及维护栖息地的稳定作用。

此外,作者在研究中还发现,在硅藻胞外多聚物的周围常存在少量的原生动物,如纤毛虫等。其他一些研究也发现,硅藻分泌的 EPS 一旦使藻体牢固地附着在基底上,一些细菌和小型动物就

会在硅藻周围聚集,硅藻分泌的 EPS 为细菌所利用,小型浮游动物则以细菌为食,形成一个微生态系统,这个微生态系统在海区的物质循环和能量传递中起着很重要的作用(Hudon *et al.*, 1981; Hoagland *et al.*, 1982; Goldsborough *et al.*, 1991),但生物之间的相互作用机制尚不清楚,有待进一步研究。

3.2 胞外多聚物(EPS)的分泌部位及机制

目前硅藻胞外多聚物分泌位置在一些种类中已比较清楚。在许多硅藻中柄的生产部位主要位于眼孔板或顶孔处,在一些种类中这些小孔也是顶垫的分泌位置;膜的分泌位置则主要位于纵沟、壳面上的孔及环带缝合处等;管状物的分泌位置分歧较大,一些研究认为由环带缝合处分泌(Cox, 1981; Hought, 1987; Millie *et al.*, 1981),其他研究则表明由纵沟分泌(Sicko-Goad *et al.*, 1989)。作者的研究表明,*A. javanica* var. *subconstricta* 细胞可在多个位置分泌胞外多聚物,如上下壳面的两端及壳面的中部,很可能是由眼孔板或顶孔处分泌;*N. ramosissima* 的 EPS 极可能在纵沟的一端,即藻体环带部位,但是运动导致 EPS 的生产还是 EPS 的生产使得胞体产生运动还需进一步研究;而 *A. coffeaeformis* 的 EPS 可能由壳面上的孔及环带缝合处分泌。目前硅藻胞外多聚物的分泌机理尚不是很清楚,作者在研究中发现,*A. javanica* var. *subconstricta* 在胞外多聚物(柄)合成前期和合成期,细胞内存在大量小泡而且这些小泡的大小和位置都在不断的变化,这些小泡极可能与胞外多聚物的分泌有关(黄世玉等¹⁾)。其他一些研究也发现,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(Edgar, 1980; Blun *et al.*, 1981; Edgar, 1983; Sicko-Goad *et al.*, 1989),同时发现细胞在合成胞外多聚物时,线粒体迅速

1) 黄世玉,王大志,2004. 爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物分泌过程及除草剂的影响研究(研究资料)

靠近高尔基体(Schmid, 1988),可能是为胞外多聚物纤维的分泌提供能量 ATP。Sicko-Goad 等(1989)在细胞质中发现了几种小泡,它们可能代表了胞外多聚物转运和释放所处的不同过程。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,释放纤维状物质(Herth, 1979)。

3.3 胞外多聚物(EPS)的化学组成

硅藻胞外多聚物化学组成的研究已有大量报道,但主要集中在浮游种类,附着种类的相关研究还比较少。Hoagland 等(1993)总结了这方面的研究成果,指出硅藻胞外多聚物主要由多糖类组成,此外还包括一些含硫大分子及少量蛋白质,目前在胞外多聚物中尚未发现脂类物质。Wustman 等(1997)的研究则表明,硅藻 EPS 主要由酸性多糖组成,此外还有少量的蛋白质及酚类物质。本研究结果也支持了上述结论:三种硅藻的 EPS 皆以多糖类为主,达总量的 70% 以上,蛋白质含量次之,不含脂类物质,但组成上有所差异,特别是 EPS 的水不溶性部分变化较大,这也反映了硅藻种间的差异。

4 结论

本研究结果表明,硅藻胞外多聚物的形态、结构和组成因种类不同而存在很大差异,这种差异导致了其功能的不同,这也是硅藻细胞对栖息环境长期适应的结果,因此,在研究硅藻胞外多聚物时必须考虑其生活习性。

参 考 文 献

- 金德祥,程兆第,林均民等,1982. 中国海洋低栖硅藻(上卷). 北京:海洋出版社,1—323
- 金德祥,程兆第,林均民等,1991. 中国海洋低栖硅藻(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—91
- Blunn G W, Evans L V, 1981. Microscopical observations on *Achnanthes subsessilis*, with particular reference to stalk formation. *Bot Mar*, 24: 193—199
- Bligh E C, Dyer W J, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem. Physiol*, 37: 911—917
- Cox E J, 1981. Mucilage tube morphology of three tube-dwelling diatoms and its diagnostic value. *Phycology*, 17: 72—80
- Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K *et al*, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 28: 350—356
- Edgar L A, 1980. Fine structure of *Caloneis amphisbaena* (Bacillariophyceae). *J Phycol*, 16: 62—72
- 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
- Goldsborough L G, Dickman M, 1991. A comparison of periphytic algal biomass and community structure on *Scirpus validus* and on a morphologically similar artificial substratum. *J Phycol*, 27: 196—206
- Goto N, Kawamura T, Mitamura O *et al*, 1999. Importance of extracellular organic carbon production in the total primary production by tidal-flat diatoms in comparison to phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser*, 190: 289—295
- Herth W, 1979. The site of β -chitin fibril formation in centric diatom. II. The chitin-forming cytoplasmic structures. *J Ultrastruct Res*, 68: 16—27
- Hoagland K D, Roemer S C, Rosowski J R, 1982. Colonization and community structure of two periphyton assemblages, with emphasis on diatoms (Bacillariophyceae). *Am J Bot*, 69: 188—213
- Hoagland K D, Rosowski J R, Gretz M R *et al*, 1993. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *J Phycol*, 29: 537—566
- Hudon C, Bourget E, 1981. Initial colonization of artificial substrate: community development and structure studied by scanning electron microscopy. *Can J Fish Aquat Sci*, 38: 1371—1384
- Houpt P M, 1987. Observations on the marine tube-dwelling diatom *Navicular pseudocomoides* in culture. *Diatom Res*, 2: 47—53
- Kelly G J, 1989. A comparison of marine photosynthesis with terrestrial photosynthesis: a biochemical perspective. *Oceanogr Mar Berkeley Annu Rev*, 27: 11—44
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al*, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265—275
- Millie D F, Wee J L, 1981. Observations on tube-dwelling diatom *Navicula tripunctata* var. *schizonemoides* (V. H) Patr. using light and electron microscopy. *Proc Iowa Acad Sci*, 88: 74—78
- Riebesell U, 1991. Partical aggregation during a diatom bloom. II. Biological aspects. *Mar Ecol Prog Ser*, 69: 281—291
- Schmid A-M M, 1988. The special Golgi-ER-mitochondrion unit in the diatom genus *Coscinodiscus*. *Pl Syst Evol*, 158: 211—223
- Sicko-Goad L, Kociolek J P, Stoermer 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 mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Res Part II*. 42(1): 75—97

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: 1051—1069

MORPHOLOGY, FINE STRUCTURE AND CHEMICAL COMPOSITION OF EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES IN THREE MARINE DIATOM SPECIES

WANG Da-Zhi, HUANG Shi-Yu[†], CHENG Zhao-Di^{††}

(The Key Laboratory of Marine Environmental Science of Ministry of Education;
Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen, 361005)

[†](Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021)

^{††}(College of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract Extracellular polymeric substances (EPSs) of diatoms that exist in the form of stalks, apical pads, adhering films and fibrils, are a type of mucilaginous substance secreted in the exterior of cells. EPSs which play important roles in the life of diatoms in their marine eco-system. This paper investigated the morphology and detailed structure of EPSs in three marine diatoms, *Achnanthes javanica* var. *subconstricta*, *Amphora coffeaeformis* and *Navicula ramosissima*, isolated from the surface of seaweed collected in the Xiamen offshore. These samples were analyzed using microscope and scanning electronic microscope (SEM) methods. Their chemical compositions were also analyzed preliminary. The results showed that the morphology of EPS varied significantly among species with individual feature. EPS of *A. javanica* var. *subconstricta* has a long transparent stalk-like EPS, which usually lies on one end of cells and is composed of three parts: collar, stalk and pad. Cells of *A. javanica* var. *subconstricta* were attached to the surface of cultured vessel through the pad and many of the cells formed a cell-line. The results from SEM showed that the close-up of the EPS had a double layered solid tube structure made of fine fibers. Moreover, some cells have two or more stalks were observed under microscope. The EPS secreted by *A. coffeaeformis* was a solid tube, which is assembled by small-tandemed segments with many interlaced tubes and gathered as colloid agglomeration, cell moved through the solid tubes and formed the lump. The EPS of *N. ramosissima* was a transparent and colloid mucous membrane, which covered on the surface of culture vessel and cells moved the membrane. There were many hollow cell hull liked membranes among of them, and spot veins were observed clearly. The preliminary results on EPS composition indicated that the compositions of both water-soluble and water-insoluble portions of EPS in the three diatoms were dominated by polysaccharides. Their contents exceeded 70% of total EPS, along with a small amount of protein, accounting for 3.2%—28% of total EPS. No lipid was found in the EPSs. Composition of polysaccharides and protein in EPSs varied greatly among different species, especially for the water insoluble portion: major composition of EPS in *A. coffeaeformis* was polysaccharides, up to 97% of total EPS content, protein content was very low, however the protein contents of EPS in *A. javanica* var. *subconstricta* and *N. ramosissima* were higher, 18.6% and 28% respectively. These data reflected different abilities in EPS production. The results indicate that the morphology of EPSs in different species are related to their habit, which is a result of long time adaptation, while chemical compositions of EPSs are species-specific, which varies with species. The function of EPSs among species is different, which is determined by their structure and algal habit, stalks are apt to those life-fixed species, tubes and membranes are apt to the motive species. Moreover, this paper also discuss the excretion mechanisms of EPSs in diatoms.

Key words Marine diatom, Extracellular polymeric substances (EPSs), Morphology, Fine structure, Chemistry constitution