

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2022.10084

李杰, 陆家昌, 赖俊翔, 张荣灿. 球形棕囊藻游离单细胞的密度与囊体形成的关系研究[J]. 植物科学学报, 2022, 40(1): 84-95

Li J, Lu JC, Lai JX, Zhang RC. Study on the relationship between solitary cell density and colony formation of *Phaeocystis globosa* Scherffel[J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(1): 84-95

球形棕囊藻游离单细胞的密度与囊体形成的关系研究

李杰, 陆家昌*, 赖俊翔*, 张荣灿

(广西科学院广西北部湾海洋研究中心, 广西近海海洋环境重点实验室, 南宁 530007)

摘要: 球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa* Scherffel) 主要以囊体形态形成赤潮, 由单细胞向囊体形态的转变是赤潮爆发的关键。本研究推测囊体形成的前提是游离单细胞达到一定密度阈值, 当密度低于该阈值时, 囊体无法形成。基于此, 本文探究了不同条件(温度、营养充气搅动、摄食压力、初始密度)下囊体形成时游离单细胞的密度。结果显示: 不同培养条件下, 囊体形成所需的游离单细胞密度不一致, 但都达到了 10^4 cells/mL 的数量级; 稀释试验表明, 利用 f/2 培养基稀释使游离单细胞的密度小于 10^4 cells/mL 时, 囊体不能形成, 而密度大于 10^4 cells/mL 的游离单细胞对照组, 在 24 h 内便有囊体形成。总的来说, 游离单细胞在高密度情况下更容易形成囊体。

关键词: 球形棕囊藻; 游离单细胞; 密度; 囊体

中图分类号: Q945.79

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)01-0084-12

Study on the relationship between solitary cell density and colony formation of *Phaeocystis globosa* Scherffel

Li Jie, Lu Jia-Chang*, Lai Jun-Xiang*, Zhang Rong-Can

(Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Beibu Gulf Marine Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: *Phaeocystis globosa* Scherffel blooms mainly develop as colonies, and thus the transition from solitary cells to colonies is key to understanding *P. globosa* blooms. We tested the hypothesis that a particular solitary cell density is necessary for colony formation, below which colonies will not form. We first cultured solitary cells under different conditions (e. g., temperature, nutrients, aeration, agitation, predator pressure, and initial densities) to identify the solitary cell density at which colonies were first observed. Results showed that solitary cell density at the time of colony appearance varied with different culture conditions but was within an order of magnitude of $\sim 10^4$ cells/mL. Following the culture experiments, a dilution experiment was conducted to determine whether colonies formed when solitary cell density was diluted with f/2 media to less than 10^4 cells/mL. Results showed that no colonies were formed. However, colonies formed within 24 h when the same inoculum was diluted with a small volume of f/2 media, which allowed the density to increase to greater than 10^4 cells/mL. Thus, solitary cells of *P. globosa* are more likely to form colonies at high density.

Key words: *Phaeocystis globosa*; Solitary cell; Density; Colony

收稿日期: 2021-07-12, 修回日期: 2021-08-02。

基金项目: 广西科技重大专项 (AA17202020); 广西自然科学基金 (2018GXNSFAA138194; 2017GXNSFAA198166)。

This work was supported by grants from the Science and Technology Major Project of Guangxi (AA17202020) and Guangxi Natural Science Foundation (2018GXNSFAA138194; 2017GXNSFAA198166)。

作者简介: 李杰 (1992-), 男, 研究实习员, 研究方向为浮游生物生态学 (E-mail: lijiegxu@126.com)。

* 通讯作者 (Authors for correspondence. E-mail: jiachanglux@163.com; laijunxiang@126.com)。

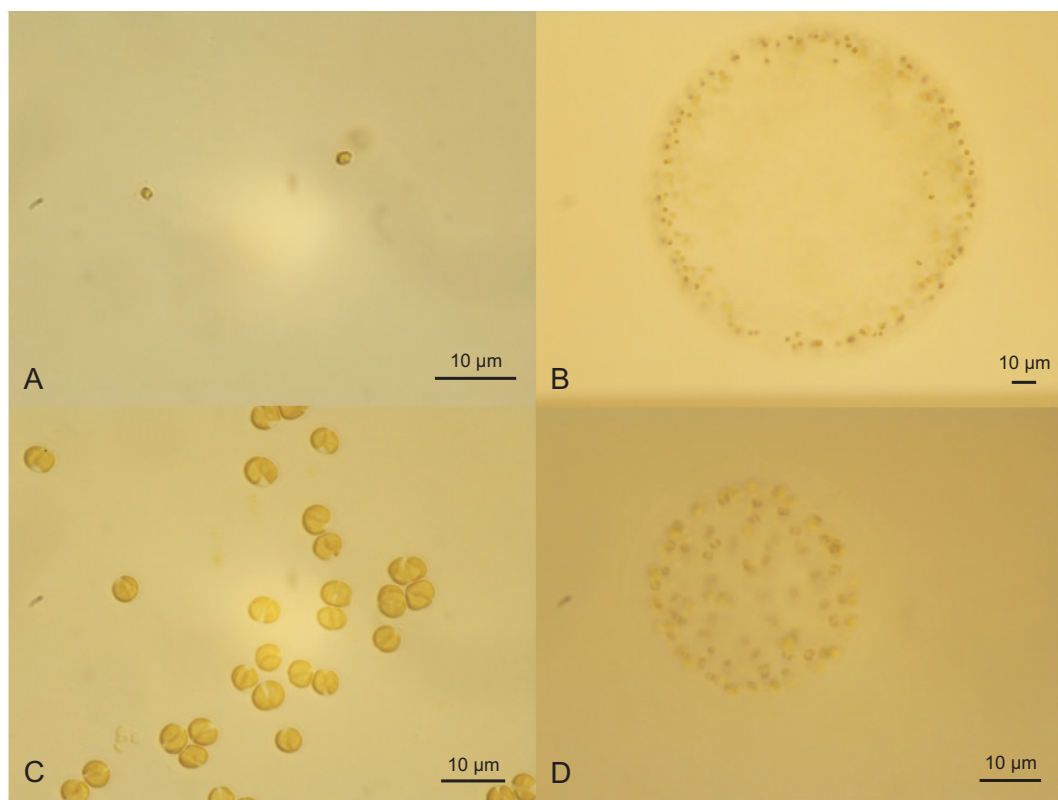
球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa* Scherffel) 是广泛分布于温带和热带海域的一种浮游植物, 可在近岸海域发展成为大规模的赤潮^[1]。球形棕囊藻赤潮会在海水表层和滩涂上形成大量的泡沫, 从而对旅游业造成不良影响^[2]。球形棕囊藻的异型生活史包含两种形态: 游离单细胞和囊体(如图 1 所示), 且二者之间存在相互转换^[1, 3]。对环境具有负面影响的主要是囊体形态, 如在赤潮期间, 悬浮在水体的高密度囊体会堵塞鱼鳃, 导致鱼类因缺氧而死亡, 对渔业经济造成重大损失^[3]。

囊体结构因对海洋环境具有长期且负面的影响, 受到了研究者的广泛关注^[4]。作为形成赤潮关键的一步, 从单细胞态到囊体态的转变过程与球形棕囊藻复杂的生活史有关^[5], 但游离单细胞形成囊体的具体机制仍有待深入研究^[6-9]。

已有报道表明, 环境因素可调节球形棕囊藻单细胞形成囊体结构。譬如, 适当的湍流有利于囊体的形成^[10]。此外, 不利环境条件也可刺激囊体的

形成, 如低温、营养缺乏和捕食者的摄食均可以促进单细胞向囊体的转变^[11-14]。虽然湍流、温度、营养物质和捕食者被认为在游离单细胞形成囊体过程中起着重要推动作用, 但这些推动因素仅与缩短囊体形成时间、增加囊体数量或增加囊体体积有关。考虑到在高温、富营养化条件下以及没有捕食者的情况下也能形成囊体, 这些外部因素显然不能决定囊体的形成, 而是仅影响了囊体的特征。球形棕囊藻的生活史包含了从单细胞到双细胞、四细胞, 再到囊体的过程, 不同阶段和不同状态的发展除了与外在环境因素有关, 也与内在的基因调控密不可分^[15]。因此, 细胞本身的因素很可能也影响着囊体形成, 如游离单细胞的密度^[16]。

基于此, 本文研究了不同环境条件对球形棕囊藻游离单细胞生长与囊体形成的影响, 以及当游离单细胞密度低于一定阈值时囊体形成的可能性。通过探讨单细胞密度与囊体形成之间的关系, 以期促进对球形棕囊藻赤潮形成机制的理解。



A: 游离单细胞; B: 囊体细胞; C、D: 囊体。

A: Solitary cells; B: Colony cells; C and D: Colony.

图 1 球形棕囊藻的单细胞和囊体

Fig. 1 Colony and solitary cells of *Phaeocystis globosa*

1 材料与方法

1.1 球形棕囊藻的培养

本研究所使用的球形棕囊藻细胞采集分离自北部湾近岸海域^[17]。在广西北部湾海洋研究中心藻种库保种培养,使用 f/2 media (-Si) 进行保种,盐度为 30‰,温度为 20℃,光照强度为 100 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$,光暗循环为 12 h : 12 h。试验所用球形棕囊藻单细胞均取自指数生长末期,将培养的藻液(包含囊体)经孔径为 10 μm 的筛绢在自然重力下过滤而得。

1.2 温度试验

温度试验共设置 4 组温度,包括 16℃、20℃、24℃ 和 28℃,每组设置 5 个平行。球形棕囊藻游离单细胞的初始接种密度为 $2.0 \times 10^3 \text{ cells/mL}$,接种体积 500 mL,置于恒温光照培养箱内培养,其他条件与保种条件一致。试验开始后每天上午 10:00 准时采集样品,共持续 10 d。

1.3 营养盐试验

基于前期结果,20℃为球形棕囊藻最适生长温度。因此营养盐试验设置的温度为 20℃。在 f/2 media 的基础上对硝酸盐和磷酸盐的含量进行修改,共设置 4 个处理组,分别是 2 倍的硝酸盐(2N)、2 倍的磷酸盐(2P)、1/4 的硝酸盐(N/4)和 1/4 的磷酸盐(P/4)。球形棕囊藻游离单细胞的初始接种密度为 $2.0 \times 10^3 \text{ cells/mL}$,接种体积为 500 mL,其他条件与保种条件一致,试验共持续 10 d,每天上午 10:00 准时采集样品。

1.4 摄食试验

以球形棕囊藻作为海洋尖尾藻(*Oxyrrhis marina* Dujardin)的食物,定期喂食,传代保种。试验前,将海洋尖尾藻通过孔径为 10 μm 的筛网进行过滤收集,并用灭菌海水多次清洗。

利用海洋尖尾藻捕食者对游离单细胞球形棕囊藻进行摄食。共设置 5 个试验瓶,5 个对照瓶,试验瓶内球形棕囊藻游离单细胞的接种密度为 $2.0 \times 10^3 \text{ cells/mL}$,海洋尖尾藻的接种密度为 5 ind./mL,接种体积 500 mL。对照瓶内不加海洋尖尾藻。温度设置为 20℃,培养基为 f/2 media。其他条件与保种条件一致。试验开始后每天上午 10:00 准时采集样品,共持续 10 d。

1.5 充气搅动试验

湍流是控制微藻生长的主要因子,在试验中进行充气可以模拟微藻生长过程的湍流环境。设置 5 个试验瓶进行充气搅动操作(100 bubbles per minute)。5 个对照瓶不进行充气搅动。球形棕囊藻游离单细胞的接种密度为 $2.0 \times 10^3 \text{ cells/mL}$,培养体积为 500 mL。其他条件与保种条件保持一致,试验开始后每天上午 10:00 准时采集样品,共持续 14 d。

1.6 不同初始密度试验

分别设置球形棕囊藻游离单细胞的初始密度为 1×10^3 、 4×10^3 、 7×10^3 、 9×10^3 和 $15 \times 10^3 \text{ cells/mL}$ 。每组试验设置 5 个平行。培养条件与保种条件一致,共培养 10 d。

1.7 稀释试验

基于前期试验结果推测,密度低于 10^4 cells/mL 时,球形棕囊藻游离单细胞不易形成囊体结构。故设计稀释试验进行验证。首先将球形棕囊藻游离单细胞接种至含有 1000 mL 培养基的玻璃锥形瓶(3500 mL)内,初始密度为 $(1.28 \times 10^3) \pm (0.29 \times 10^3) \text{ cells/mL}$,设置 3 个平行。试验开始后,每隔 12 h 测定每个瓶子的游离单细胞密度,当密度高于 $9.0 \times 10^3 \text{ cells/mL}$ 时,向瓶内加入新鲜配制的 f/2 media 进行稀释,同时控制单细胞密度不低于 $8.0 \times 10^3 \text{ cells/mL}$ 。每隔 12 h 记录稀释后单细胞的密度。当培养液体积大于 2500 mL 时,稀释前先去除部分培养液,确保稀释后的培养液体积小于 2500 mL。分别在 108、144 和 180 h 时移出的部分培养液继续在同等条件下培养,同时继续使用 f/2 media 进行稀释,但允许球形棕囊藻游离单细胞密度的增加,直至囊体形成,即停止观察。稀释试验的培养条件与保种条件一致。

1.8 密度测定及球形棕囊藻囊体特征

为了检测球形棕囊藻游离单细胞和海洋尖尾藻的密度,取 2 mL 培养液,加入 1.5% 的鲁哥-碘溶液固定,置于低温暗处保存。在倒置显微镜(Nikon Ti-s)下,利用浮游植物计数框进行细胞计数。取 5 ~ 10 mL 培养液进行囊体检查,发现囊体后立即对其密度、直径和表面细胞密度进行测定。

1.9 数据分析

对试验数据进行单因素方差(one-way ANO-

VA) 分析。利用最小差异 (LSD) 检验对温度试验、营养盐试验以及不同初始密度试验进行差异分析。使用 *t*-test 检验对摄食和充气搅动试验进行差异分析。上述分析所用软件均为 SPSS 16.0, 显著水平设置为 5%。

2 结果与分析

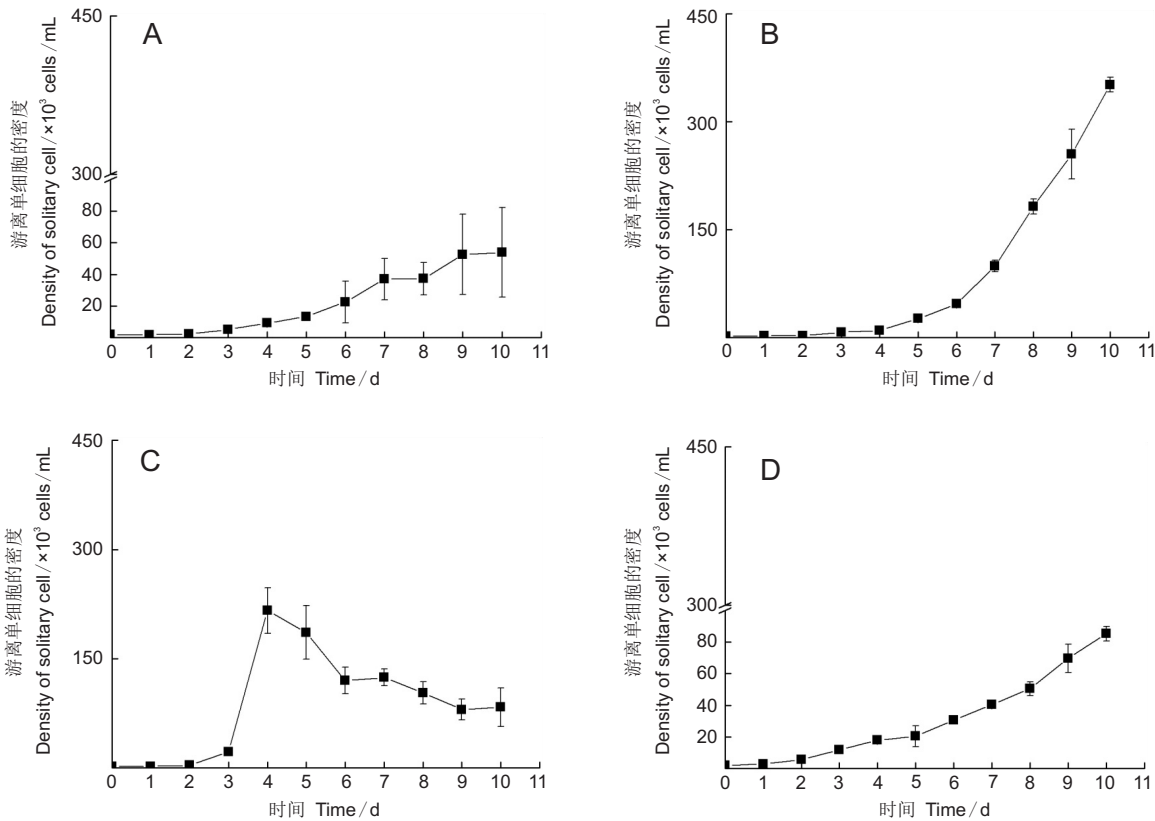
2.1 温度对球形棕囊藻的囊体参数及游离单细胞密度的影响

4 个温度组均发现了球形棕囊藻的囊体, 根据游离单细胞生长曲线, 20℃为球形棕囊藻的最适生长温度(图 2: B); 16℃和 28℃时, 游离单细胞的生长受到抑制; 24℃条件下出现了爆发式增长, 但仅持续了 1 d 便消退。囊体形成前, 单细胞的生长速率随温度升高而增加, 在 24℃时达到最高(表 1), 但此时单位囊体面积的细胞数最少。在 28℃和 16℃条件下, 尽管囊体

的直径最大, 但囊体的密度最小。除 24℃外, 其余 3 个温度下, 球形棕囊藻游离单细胞形成囊体的密度随温度的升高而增加(图 2: A、C、D)。所有温度组的游离单细胞形成囊体时的密度均超过 10^4 cells/mL。

2.2 氮磷营养条件对囊体参数及游离单细胞密度的影响

所有营养盐处理组均有囊体出现, 但寡营养盐组 (N/4 和 P/4) 出现时间更早。而富营养盐组 (2N 和 2P) 在试验结束时游离单细胞密度更高(图 3: A、B)。囊体形成前, 寡营养盐组的游离单细胞生长率较富营养盐组的更高; 囊体出现时, 富营养组的游离单细胞密度比寡营养组更高, 二者均超过了 10^4 cells/mL(表 2)。相对于磷盐, 囊体对氮盐更敏感; 2N 和 N/4 实验组的囊体密度和囊体表面细胞数有显著差异, 但 2P 和 P/4 之间无显著差异(表 2)。



A、B、C 和 D 分别为 16℃、20℃、24℃ 和 28℃ 温度组。
A, B, C, and D represent 16℃, 20℃, 24℃, and 28℃, respectively.

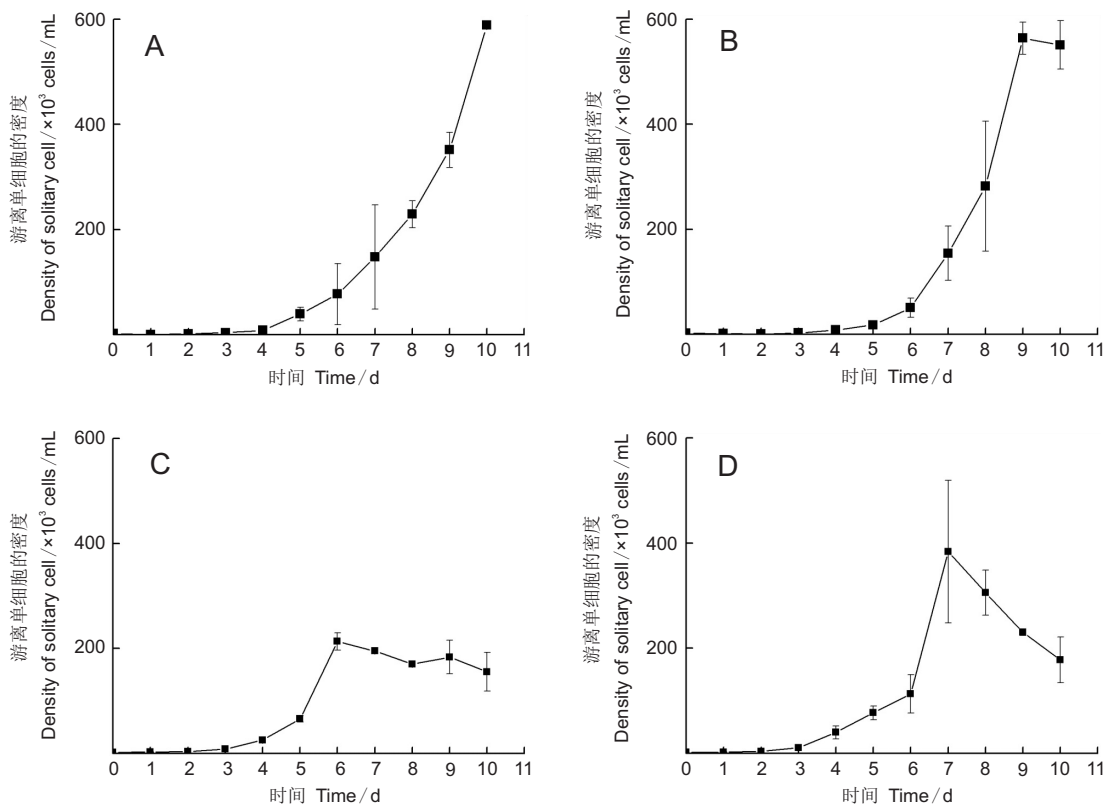
图 2 不同温度条件下球形棕囊藻游离单细胞的密度变化趋势

Fig. 2 Density trend of solitary cells of *P. globosa* under different temperatures

表 1 不同温度下囊体参数与单细胞密度及生长率
Table 1 Colony parameters, solitary cell densities, and cell growth rates at different temperatures

囊体及游离单细胞参数 Parameters of colony or solitary cell	温度梯度 Temperature group			
	16℃	20℃	24℃	28℃
囊体密度 Colony density/ind./L	333 ± 191a	535 ± 324b	857 ± 515c	333 ± 260a
囊体直径 Colony diameter/μm	73.37 ± 31.05a	33.90 ± 15.49b	60.66 ± 37.53c	75.93 ± 40.14a
囊体表面细胞密度 Cells per unit colony area/×10 ⁻³ cells/μm ²	4.24 ± 1.60a	6.63 ± 2.05b	2.78 ± 0.81c	3.31 ± 1.68ac
囊体出现时游离单细胞的密度 Solitary cell density at time of colony appearance/ ×10 ³ cells/mL	10.25 ± 1.53a	10.03 ± 2.18a	22.23 ± 3.64b	18.00 ± 2.52c
囊体出现前细胞生长率 Cell growth rate before colony appearance	0.38 ± 0.04a	0.40 ± 0.04a	0.80 ± 0.14b	0.55 ± 0.03c
囊体出现时间 Appearance time of colony/d	4	4	3	4

注:不同字母表示不同处理组间在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。下同。
Note: Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$). Same below.



A, B, C 和 D 分别为 2N、2P、N/4 和 P/4 实验组。
A, B, C, and D represent 2N, 2P, N/4, and P/4 group, respectively.

图 3 不同营养盐条件下球形棕囊藻游离单细胞的密度变化趋势
Fig. 3 Density trend of solitary cells of *P. globosa* under different nutrient conditions

2.3 摄食压力条件下球形棕囊藻的囊体参数以及
游离单细胞的密度变化

摄食压力组和对照组均有囊体形成,但摄食压

力组的囊体出现时间较晚(表 3),游离单细胞密度
较低,但二者均达到了 10^4 cells/mL 水平。囊体
出现前后,游离单细胞均受到来自海洋尖尾藻的摄

表 2 不同营养盐条件下囊体特征与单细胞密度及生长率

Table 2 Colony parameters, solitary cell densities, and cell growth rates under different nutrient conditions

囊体及游离单细胞参数 Parameters of colony or solitary cell	营养条件 Nutrient group			
	2N	N/4	2P	P/4
囊体密度 Colony density/ind./L	1056 ± 509a	444 ± 96b	839 ± 118c	805 ± 756c
囊体直径 Colony diameter/μm	66.06 ± 37.06a	47.93 ± 29.65b	95.55 ± 28.76c	70.90 ± 30.45a
囊体表面细胞密度 Cells per unit colony area/×10 ⁻³ cells/μm ²	4.77 ± 2.32a	8.04 ± 3.03b	4.80 ± 2.83a	4.90 ± 3.51a
囊体出现时游离单细胞的密度 Solitary cell density at time of colony appearance/ ×10 ³ cells/mL	77.19 ± 37.97a	23.94 ± 0.51b	50.55 ± 18.26a	33.12 ± 8.28c
囊体出现前细胞生长率 Cell growth rate before colony appearance	0.58 ± 0.20a	0.63 ± 0.02b	0.53 ± 0.80a	0.74 ± 0.09c
囊体出现时间 Appearance time of colony/d	6	4	6	4

表 3 对照组与摄食组的囊体参数与单细胞密度及生长率

Table 3 Colony parameters, solitary cell densities, and cell growth rates in predator coexistence system (G-Experiment) and control (Control-G)

囊体及游离单细胞参数 Parameters of colony or solitary cell	摄食组 G-Experiment	对照组 Control-G
囊体密度 Colony density/ind./L	733 ± 316 *	567 ± 231 *
囊体直径 Colony diameter/μm	81.85 ± 40.67 *	50.62 ± 39.63 *
囊体表面细胞密度 Cells per unit colony area/×10 ⁻³ cells/μm ²	3.44 ± 1.45 *	5.83 ± 2.36 *
囊体出现时游离单细胞的密度 Solitary cell density at time of colony appearance/×10 ³ cells/mL	15.52 ± 4.74 *	20.05 ± 5.14 *
囊体出现前细胞生长率 Cell growth rate before colony appearance	0.40 ± 0.07 *	0.56 ± 0.10 *
囊体出现时间 Appearance time of colony/d	5	4

注：* 表示组间在 $P < 0.05$ (t -test) 水平上差异显著。下同。
Note: * indicates a significant difference ($P < 0.05$, t -test) between the two groups. Same below.

食压力，特别是在培养 7 d 后，捕食者海洋尖尾藻的数量明显增加(图 4 和表 3)。与对照组相比，摄食压力组的囊体直径和囊体密度较大，而囊体表面的细胞密度却较低。

2.4 充气搅动对球形棕囊藻囊体参数及游离单细胞密度的影响

充气培养对球形棕囊藻游离单细胞的生长有抑制作用(图 5)。充气培养组游离单细胞在囊体形成之前的生长率高于对照组(表 4)。充气条件下，球形棕囊藻囊体的密度、直径以及表面细胞数低于对照组的囊体(表 4)。充气带来的搅动延迟了囊体的

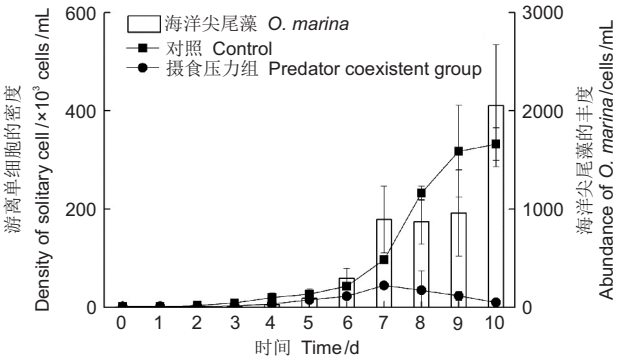


图 4 球形棕囊藻游离单细胞和海洋尖尾藻的密度变化
Fig. 4 Density of solitary cells of *P. globosa* and abundance of *O. marina*

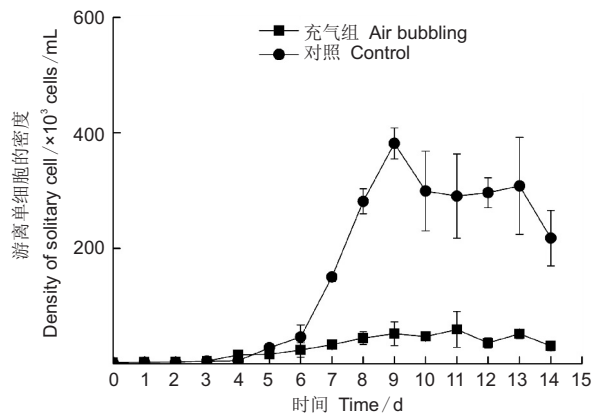


图 5 充气搅动条件下球形棕囊藻单细胞的密度
Fig. 5 Density of solitary cells of *P. globosa* under bubbling conditions

表 4 对照组与充气组的囊体参数与单细胞密度及生长率
Table 4 Colony parameters, solitary cell densities, and cell growth rates under air bubbling (B-Experiment) and control conditions (Control-B)

囊体及游离单细胞参数 Parameters of colony or solitary cell	充气组 B-Experiment	对照组 Control-B
囊体密度 Colony density/ind./L	438 ± 88 *	667 ± 260 *
囊体直径 Colony diameter/μm	23.50 ± 10.88 *	45.09 ± 16.57 *
囊体表面细胞密度 Cells per unit colony area/×10 ⁻³ cells/μm ²	3.88 ± 1.23 *	5.50 ± 1.00 *
囊体出现时游离单细胞的密度 Solitary cell density at time of colony appearance/×10 ³ cells/mL	23.64 ± 2.51 *	27.60 ± 2.30 *
囊体出现前细胞生长率 Cell growth rate before colony appearance	0.40 ± 0.08 *	0.24 ± 0.03 *
囊体出现时间 Appearance time of colony/d	6	5

出现，在囊体出现时，游离单细胞的密度低于对照组，但达到了 10⁴ cells/mL 数量级(表 4)。

2.5 不同初始密度对球形棕囊藻的囊体及游离单细胞的影响

不同初始密度接种的球形棕囊藻游离单细胞均可以形成囊体，形成囊体所需时间随接种密度的提高而减少，但至少需要 3 d(图 6，表 5)。在试验过程中，棕囊藻游离单细胞的密度逐渐升高，但当接种初始密度高于 9 × 10³ cells/mL 时，游离单细胞密度便不会有明显的提高(表 5)。囊体形成时，所有试验组的游离单细胞密度均达到了 10⁴ cells/mL 数量级。囊体形成前，游离单细胞的生长率随接种密度的增加而提高。囊体参数与接种细胞密度无明显相关。

2.6 稀释实验中游离单细胞的密度变化

将游离单细胞密度稀释至 10⁴ cells/mL 以

下(维持在 9.0 × 10³ cells/mL)时，未发现囊体的形成。稀释试验的初始接种密度为 (1.28 × 10³) ± (0.29 × 10³) cells/mL。培养 48 h 后开始第 1 次稀释，此时游离单细胞密度接近 10⁴ cells/mL。从第 48 h 至试验结束，游离单细胞的平均密度为 (8.26 × 10³) ± (0.79 × 10³) cells/mL。其中部分培养母液在 108、144 和 180 h 时开始进行小规模稀释，形成独立于培养母液的培养瓶。在 108、144 和 180 h 移除培养母液的独立培养瓶均在接下来的 24 h 内出现囊体，游离单细胞的密度分别为 (12.98 × 10³) ± (6.26 × 10³)、(15.12 × 10³) ± (3.07 × 10³) 和 (15.23 × 10³) ± (2.94 × 10³) cells/mL。在 204 和 216 h 时候，培养母液的游离单细胞密度暂时超过了 10 × 10³ cells/mL，但立即被稀释至低于 9.0 × 10³ cells/mL(图 7)。

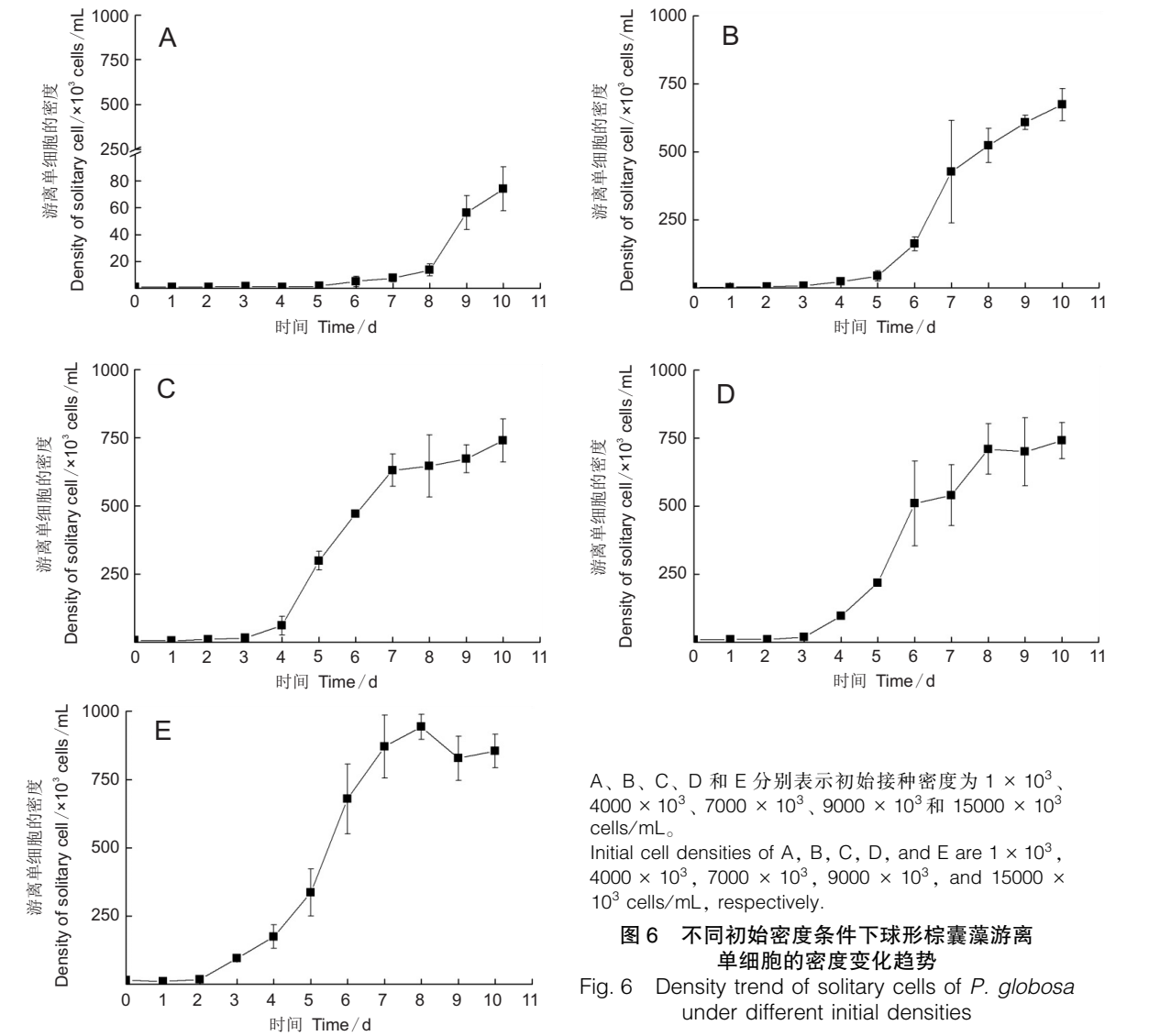
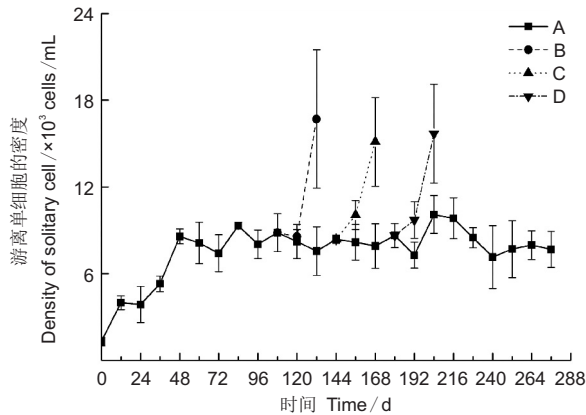


表 5 不同初始密度条件下球形棕囊藻的囊体参数与单细胞密度及生长率
Table 5 Colony parameters, solitary cell densities, and cell growth rates under different initial solitary cell densities

囊体及游离单细胞参数 Parameters of colony or solitary cell	初始接种密度/ $\times 10^3$ cells/mL Initial density				
	1	4	7	9	15
囊体密度 Colony density/ind./L	483 \pm 284ad	313 \pm 88ab	277 \pm 166c	433 \pm 115a	667 \pm 520d
囊体直径 Colony diameter/ μ m	58.66 \pm 35.88a	35.79 \pm 10.99c	48.11 \pm 20.76ab	34.01 \pm 21.11c	38.61 \pm 27.10bc
囊体表面细胞密度 Cells per unit colony area/ $\times 10^{-3}$ cells/ μ m ²	5.40 \pm 2.27a	7.34 \pm 1.28b	6.28 \pm 2.83bc	9.25 \pm 2.25d	7.74 \pm 2.65cd
囊体出现时游离单细胞的密度 Solitary cell density at time of colony appearance/ $\times 10^3$ cells/mL	13.73 \pm 4.57a	43.98 \pm 18.80b	61.13 \pm 33.83c	96.75 \pm 12.83d	95.04 \pm 4.99d
囊体出现前细胞生长率 Cell growth rate before colony appearance	0.32 \pm 0.04a	0.47 \pm 0.08b	0.51 \pm 0.16c	0.59 \pm 0.04d	0.62 \pm 0.02d
囊体出现时间 Appearance time of colony/d	8	5	4	4	3



A 为原始培养瓶内游离单细胞的密度；B、C 和 D 分别为在 108、144 和 180 h 处从原始培养瓶分离出来的游离单细胞密度。
A is cell density of mother culture solution; B, C, and D are cell densities of independent cultures from mother culture solution removed at 108, 144 and 180 h, respectively.

图 7 球形棕囊藻游离单细胞的密度
Fig. 7 Density of solitary cells of *P. globosa*

3 讨论

3.1 不同温度下形成囊体所需的游离单细胞密度

本试验所用的球形棕囊藻藻种分离自北部湾近岸海域，试验设置的温度为北部湾春（20℃）、夏（28℃）、秋（24℃）和冬（16℃）的平均温度^[17]。在北部湾近岸海域，球形棕囊藻的囊体一般在冬季和春季形成，但本研究结果显示，4 个温度下均可形成囊体。在自然条件下，球形棕囊藻的囊体很少出现在水温较高的暖季，暖季一般以游离单细胞的形态存在，但在实验室条件下，游离单细胞于 17℃ ~ 30℃ 之间形成囊体结构的现象常有报道^[12-14, 16-20]。

如果自然条件下球形棕囊藻单细胞形成囊体结构需要一定的密度，那么 4 个温度条件下存在不同成囊密度的现象可以放大到北部湾海域的 4 个季节：在 28℃ 时，球形棕囊藻单细胞形成囊体需要较高的密度，且此时细胞的生长速率受到抑制。此外，夏秋季时北部湾的浮游动物有着较强的摄食压力^[21]。因此，夏季很难发现球形棕囊藻的囊体，可能原因之一就是游离单细胞无法到达形成囊体所需要的密度。到了秋季，随着温度的下降，球形棕囊藻游离单细胞出现了爆发性的增殖，但在 24℃ 条件下，游离单细胞形成囊体却需要最高的成囊密度。同时，秋季浮游动物的摄食压力仍然很强。因此，24℃ 并非有利于球形棕囊藻形成囊体的温度。

但该温度下的爆发性增殖使得部分细胞能够躲避来自浮游动物的摄食，促进下一个季节水体中游离单细胞的积累。在 16℃ 和 20℃ 时，形成囊体所需的游离单细胞密度较低，生长速率也较慢，但在试验结束时，20℃ 处理组的单细胞密度却达到了最高。20℃ 处理组所形成的囊体直径最小，这些囊体极有可能躲避部分的捕食者，从而进入下一个寒冷的季节继续繁殖发育。因此，在自然水体中，寒冷季节可能是最适合球形棕囊藻单细胞形成囊体的季节^[22]。

3.2 不同氮、磷浓度下形成囊体所需游离单细胞的密度

营养物质是控制球形棕囊藻生长的关键因素。一般来说，在营养盐充足（2N 和 2P）条件下藻的生长情况要比营养盐不足（N/4 和 P/4）时更好。但营养盐的不足却触发了囊体的形成，加快了囊体出现的步伐。有研究指出，营养盐缺乏会缩短游离单细胞到囊体出现的时间^[11, 23, 24]。与此相似，本文发现在营养缺乏情况下，囊体比在营养充足时提前出现。值得注意的是，在营养盐相对缺乏情况下，囊体出现前的游离单细胞有着较高的生长率，表明在囊体形成前，营养盐的缺乏刺激了游离单细胞的生长。假设球形棕囊藻游离单细胞需要到达一定的密度才能形成囊体，在营养盐缺乏情况下，游离单细胞具有更高的生长率才能更快地到达形成囊体所需的密度，然后转变成囊体形态，以更具有竞争优势的形态应对恶劣的自然环境。值得注意的是，在 2N 和 N/4 两个处理之间，囊体表面的细胞数表现出显著差异，但在 2P 和 P/4 处理之间却无显著差异，可能相对于磷酸盐，囊体细胞对硝酸盐具有更高的敏感性。

3.3 摄食压力下形成囊体所需游离单细胞的密度

海洋尖尾藻是游离球形棕囊藻单细胞的捕食者之一^[25]，在二者共存的情况下，球形棕囊藻单细胞的生长受到了抑制。囊体的形成被认为是游离单细胞抵御摄食的一种措施，且捕食者的刺激会增加囊体的直径，提高囊体的密度^[13, 26]。本研究发现，与对照相比，摄食压力实验组所形成的囊体密度更高，直径更大。从囊体出现的时间上看，摄食压力组的时间要晚于对照。尽管时间不同，但二者均会出现囊体^[13, 26]，这表明摄食压力对囊体的出现与否并没有决定性的作用。

无论捕食者存在与否,囊体形成时游离单细胞的密度都达到了 10^4 cells/mL 以上。如果游离单细胞形成囊体需要到达一定的密度范围,那么捕食者摄食或捕食者本身产生的信号就有可能促使囊体的形成,而在存在捕食者的情况下,所形成囊体的表面细胞数也应该相对较低。然而本研究表明,相对于摄食压力组,对照组形成的囊体表面细胞密度更高。摄食压力组囊体延迟形成,可能是因为捕食者的摄食不完全使得游离单细胞的生长量下降,导致游离单细胞的数量延迟到达成囊所需的密度造成的。

北部湾近岸海域浮游动物丰度年均值为 789.95 ind./m³, 枯水期平均丰度为 1540.19 ind./m³[27], 其中微型浮游动物(2 ~ 200 μm)对初级生产力的摄食压力最高可达 438.40%^[21, 28]。尤其是在钦州湾海域,当地的桡足类优势种—强额孔雀水蚤,对球形棕囊藻的单细胞具有很高的摄食率,但即使强额孔雀水蚤的丰度达到 2535 ± 2203 ind./m³, 仍然有囊体的形成^[29]。因此,摄食压力可能与囊体形成没有直接的关系。

3.4 充气条件下形成囊体所需游离单细胞的密度

充气能够增加水体湍流,提高水中 CO₂ 浓度,是一种增加藻类产量的常用方法。同时,充气可以有效混合水体中的有机体,并快速更新细胞周围的营养物质^[30]。本研究中,充气处理组的细胞生长速率高于对照组。充气在一定程度上加强了水中各物质的混合。但附着在瓶壁上的单细胞其作为囊体形成的基础^[31],搅动对其形成囊体反而起到了抑制作用^[6]。本研究也发现,与对照相比,搅动处理组囊体的密度、直径以及表面细胞数都较低。此外,囊体形成后,充气处理组游离单细胞的生长也受到了抑制,充气处理组的游离单细胞的密度较低。

球形棕囊藻单细胞形成囊体后其生长受到抑制。与对照相比,充气组的游离单细胞密度相对较低,可能是由于游离单细胞在混合水体快速生长和繁殖,形成囊体,但新形成的囊体较为脆弱,易被气泡扰动破碎,后续形成的囊体继续此循环。因此,在充气组囊体碎片居多,游离单细胞数量较少。

3.5 不同初始密度条件下形成囊体所需游离单细胞的密度

在不同的初始密度处理组中,囊体出现时游离

单细胞的密度均在 10^4 cells/mL 之上,且初始接种密度在 $1 \times 10^3 \sim 9 \times 10^3$ cells/mL 之间时,囊体出现时的游离单细胞密度随着接种密度的增加而增加,而初始接种密度在 $9 \times 10^3 \sim 15 \times 10^3$ cells/mL 时,囊体出现时的游离单细胞密度与接种密度没有显著关系。在其它试验处理中,囊体形成时的密度为 $10.03 \times 10^3 \sim 27.60 \times 10^3$ cells/mL,那么当初始接种密度为 15×10^3 cells/mL 时应立即形成囊体,但实际上,在试验开始第 3 d 时才出现囊体。这可能是由于游离单细胞转变成囊体需要时间所致^[23]。有研究发现,初始接种的密度为大于 10^4 cells/mL 时,形成囊体的所需要的时间也为 3 d^[6]。随着接种密度的增加,游离单细胞形成囊体所需的时间却在减少,这就意味着形成囊体存在密度阈值。

3.6 囊体形成所需的游离单细胞密度

基于上述讨论,存在特定的游离单细胞密度的假设有助于解释在不同试验条件下的囊体形成。稀释试验结果表明,游离单细胞密度低于 10^4 cells/mL 时,囊体不能形成。稀释主要是改变了营养盐浓度和细胞密度。母液培养基与次级培养基的区别在于添加了体积不等的 f/2 培养基,但其中的营养物质浓度(N 和 P)以及游离单细胞浓度仍然在设置的初始密度范围内。在营养盐和初始密度试验中,形成囊体时游离单细胞都达到了 10^4 cells/mL 数量级。因此可以认为,在室内培养条件下,游离单细胞的密度低于 10^4 cells/mL 时,囊体不易形成,但自然条件下还有待研究。

有研究表明,通过过滤含有囊体的棕囊藻培养液获得的游离单细胞主要以二倍体为主^[20]。本研究所使用的细胞主要也以二倍体细胞为主,同时也有少量的四倍体细胞。单倍体细胞不能形成囊体,只有二倍体细胞可以发展形成囊体^[8, 9]。尽管有研究报道,囊体可以通过二倍体细胞二分裂的方式获得,但在囊体出现时,游离二倍体单细胞的密度也达到了 10^4 cells/mL^[6, 7]。

游离单细胞需要达到一定的密度才能形成囊体的机制仍然有待研究。球形棕囊藻细胞可以从捕食者中获得化学信号感应^[13],也可以从其它细胞接收信号。因此,可以推测,游离单细胞可以通过产生或接收某种化学信号来感应群体细胞的密度,当达到一定密度之后,成囊相关的程序基因便会被激活,然后才能形成囊体^[32]。一些海洋细菌也有

类似的群体感应现象,它们利用可扩散的化学信号来感应群体的密度,并启动粘附、营养获取和集体防御等群体行为^[33]。

4 结论

不同培养条件下,球形棕囊藻形成囊体时需要游离单细胞达到不同的密度;室内条件下,初始游离单细胞的密度越高,囊体形成所需的时间越短。

参考文献:

- [1] Veldhuis MJW, Brussaard CPD, Noordeloos AAM. Living in a *Phaeocystis* colony: a way to be a successful algal species[J]. *Harmful Algae*, 2005, 4(5): 841–858.
- [2] Lundgren V, Li EG. Grazer-induced defence in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae): Influence of different nutrient conditions[J]. *Limnol Oceanogr*, 2010, 55(5): 1965–1976.
- [3] 沈萍萍, 齐雨藻, 欧林坚. 中国沿海球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)的分类、分布及其藻华[J]. 海洋科学, 2018, 42(10): 146–162.
Shen PP, Qi YZ, Ou LJ. *Phaeocystis globosa* in coastal China: taxonomy, distribution and its blooms[J]. *Marine Sciences*, 2018, 42(10): 146–162.
- [4] Peperzak L, Duin RNM, Colijn F, Gieskes WW. Growth and mortality of flagellates and non-flagellate cells of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae)[J]. *J Plankton Res*, 2000, 22(1): 107–120.
- [5] Schoemann V, Becquevort S, Stefels J, Rousseau V, Lancelot C. *Phaeocystis* blooms in the global ocean and their controlling mechanisms: a review[J]. *J Sea Res*, 2005, 53(1–2): 43–66.
- [6] Cariou V, Casotti R, Birrien JL, Vaulot D. The initiation of *Phaeocystis* colonies[J]. *J Plankton Res*, 1994, 16(5): 457–470.
- [7] Rousseau V. The life cycle of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae): evidence and hypotheses[J]. *J Marine Syst*, 1994, 5(1): 23–39.
- [8] Rousseau V, Chrétiennot-Dinet MJ, Jacobsen A, Verity P, Whipple S. The life cycle of *Phaeocystis*: state of knowledge and presumptive role in ecology[J]. *Biogeochemistry*, 2007, 83(1–3): 29–47.
- [9] Peperzak L, Gähler-schwarz S. Current knowledge of the life cycles of *Phaeocystis globosa* and *Phaeocystis antarctica* (Prymnesiophyceae)[J]. *J Phycol*, 2012, 48(3): 514–517.
- [10] Schapira M, Seuront L, Gentilhomme V. Effects of small-scale turbulence on *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) growth and life cycle[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2006, 335(1): 27–38.
- [11] Veldhuis MJW, Admiraal W. Influence of phosphate depletion on the growth and colony formation of *Phaeocystis pouchetii* [J]. *Mar Biol*, 1987, 95(1): 47–54.
- [12] Huang CJ, Dong QX, Zheng L. Taxonomic and ecological studies on a large scale *Phaeocystis pouchetii* bloom in the southeast coast of China during late 1997[J]. *Oceanol Limnol Sin*, 1999, 30(6): 581–590.
- [13] Tang KW. Grazing and colony size development in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae): the role of a chemical signal[J]. *J Plankton Res*, 2003, 25(7): 831–842.
- [14] Verity PG, Medlin LK. Observations on colony formation by the cosmopolitan phytoplankton genus *Phaeocystis* [J]. *J Mar Syst*, 2003, 43(3–4): 153–164.
- [15] Zhang SF, Zhang K, Cheng HM, Lin L, Wang DZ. Comparative transcriptomics reveals colony formation mechanism of a harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa* [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 719: 137454.
- [16] 晏荣军. 球形棕囊藻与溶藻细菌的关系研究[D]. 广州: 暨南大学, 2006.
- [17] 覃仙玲, 赖俊翔, 陈波, 姜发军, 许铭本. 棕囊藻北部湾株的 18S rDNA 分子鉴定[J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(2): 176–181.
Qin XL, Lai JX, Chen B, Jiang FJ, Xu MB. Molecular identification of *Phaeocystis* from Beibu Gulf Based on 18S rDNA sequences[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2016, 24(2): 176–181.
- [18] Guillard RRL, Hellebust JA. Growth and the production of extracellular substances by two strains of *Phaeocystis pouchetii* [J]. *J Phycol*, 2010, 7: 330–338.
- [19] Hoepffner N, Haas LW. Electron microscopy of nanoplankton from the North Pacific Central Gyre[J]. *J Phycol*, 2010, 26(3): 421–439.
- [20] Vaulot D, Birrien JL, Marie D, Casotti R, Veldhuis MJ, et al. Morphology, ploidy, pigment composition, and genome size of cultured strains of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae)[J]. *J Phycol*, 2010, 30(6): 1022–1035.
- [21] 郑白雯, 曹文清, 林元烧, 郑连明, 张文静, 等. 北部湾北部生态系统结构与功能研究 II. 浮游动物数量分布及优势种[J]. 海洋学报, 2014, 36(4): 82–90.
Zheng BW, Cao WQ, Lin YS, Zheng LM, Zhang WJ, et al. Ecosystem structure and function in northern Beibu Gulf II. Quantitative distribution and dominant species of zooplankton[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36(4): 82–90.
- [22] Wang XD, Song HY, Wang Y, Chen, NS. Research on the biology and ecology of the harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa* in China: progresses in the last 20 years[J]. *Harmful Algae*, 2021(2): 102057.
- [23] Imis V, Veldhuis MJ, Admiraal W, Colijn F. Chemical and

- physiological changes of phytoplankton during the spring bloom, dominated by *Phaeocystis pouchetii* (Haptophyceae): observations in Dutch coastal waters of the North Sea[J]. *Neth J Sea Res*, 1986, 20(1): 49–60.
- [24] Riegman R, Noordeloos AA, Cadée GC. *Phaeocystis* blooms and eutrophication of the continental coastal zones of the North Sea[J]. *Mar Sci*, 1992, 112(3): 479–484.
- [25] Hansen FC, Reckermann M, Breteler WK, Riegman R. *Phaeocystis* blooming enhanced by copepod predation on protozoa-evidence from incubation experiments[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1993, 102(1–2): 51–57.
- [26] Jakobsen HH, Tang KW. Effect of protozoan grazing on colony formation in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) and the potential costs and benefits[J]. *Aquat Microb Ecol*, 2002, 27: 261–273.
- [27] 庞碧剑, 蓝文陆, 黎明民, 李天深. 北部湾近岸海域浮游动物群落结构特征及季节变化[J]. *生态学报*, 2019, 39(19): 7014–7024.
- Pang BJ, Lan WL, Li MM, Li TS. Community structure and seasonal variation of zooplankton in coastal Beibu Gulf[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(19): 7014–7024.
- [28] 马璐, 曹文清, 张文静, 林元烧, 郑连明, 等. 北部湾北部海域夏季微型浮游动物对浮游植物的摄食压力[J]. *生态学报*, 2014, 34(3): 546–554.
- Ma L, Cao WQ, Zhang WJ, Lin YS, Zheng LM, *et al.* An ecological study on zooplankton in the northern Beibu Gulf: the effects of microzooplankton grazing on phytoplankton in summer[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 34(3): 546–554.
- [29] 陆家昌, 李杰, 赖俊翔, 王英辉, 姜发军, 等. 广西近岸强额孔雀水蚤对球形棕囊藻的下行控制[J]. *广西科学院学报*, 2020, 36(3): 323–329.
- Lu JC, Li J, Lai JX, Wang YH, Jiang FJ, *et al.* Top-down control of *Parvocalanus crassirostris* on *Phaeocystis globosa* in coastal water of Guangxi[J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2020, 36(3): 323–329.
- [30] Rodríguez-Maroto JM, Jiménez C, Aguilera J, Niell FX. Air bubbling results in carbon loss during microalgal cultivation in bicarbonate-enriched media: experimental data and process modeling[J]. *Aquacult Eng*, 2005, 32(3–4): 493–508.
- [31] Kayser H. Experimental-ecological investigations on *Phaeocystis pouchetii* (Haptophyceae): cultivation and waste water test[J]. *Helgoland Mar Res*, 1970, 20(1): 195–212.
- [32] 张圣洁, 蔡中华, 朱伟胜, 曾艳华, 周进. 藻际环境中胞外聚合物的研究进展[J]. *微生物学报*, 2020, 60(8): 1521–1533.
- Zhang SJ, Cai ZH, Zhu WS, Zeng YH, Jin Z. Advances in extracellular polymeric substances in phycosphere environment[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(8): 1521–1533.
- [33] Hmelo LR. Quorum sensing in marine microbial environments[J]. *Annu Rev Mar Sci*, 2017, 9(1): 257–281.

(责任编辑: 李惠英)