维普资讯 http://www.cqvip.com

第 14 卷第 1 期　　暨南大学学报(自然科学)　　Vol.14 No.1
1993 年 1 月　　Journal of Jinan University(Natural Science)　　Jan. 1993

(15)73-79,82

两种赤潮藻对温度、氮、磷营养的反应及活体荧光特性的研究

武宝玨　蒋海鹰　齐雨藻
(水生生物研究所)

Q949.2

摘要　在实验室分批培养条件下，研究了温度及氮磷营养元素对两种赤潮藻增殖的影响，发现海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)要求的温度较低，其生长最适温度为 23 ℃，生长温度上限在 33 ℃ 至 34 ℃ 之间；微小角毛藻(*Chaetoceras minutissmus*)的生长最适温度约为 30 ℃，生长温度上限在 41 ℃ 与 44 ℃ 之间。氮磷缺乏使两种藻的增殖受阻，生长周期缩短，且缺氮比缺磷的影响大。测定表明两种藻的荧光激发光谱的高峰位置都在 580 nm 附近，而荧光发射光谱的峰位为 675 nm.DCMU 能引起两种藻活体荧光的增益，海洋原甲藻的增益荧光比率(F_D/F_N)为 2.5，角毛藻的荧光比率较低，通常小于 2.0.

关键词：赤潮藻；温度；氮磷营养盐；活体荧光特性

中图分类号：Q 945.1

近年来赤潮发生日益频繁，有全球性扩张之势。浮游藻类大规模积累与生物的，化学的和物理的因素相关联，其发生机理可分为两个方面，一是赤潮本身的内在过程，其次是与其它种属以及捕食者的关系。在内在过程中，除了藉孢囊(cysts)方式大量增殖外，各种生长控制因子的作用十分重要[7]，其中又以氮、磷居首要地位，水体富营养化是触发赤潮的因素[1]。另外，适宜的水温是藻类快速生长的必要条件。因此研究这些因子在赤潮藻增殖中的作用有重要参考价值。甲藻和硅藻是构成赤潮的两大藻类，其中海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)和微小角毛藻(*Chaetoceras minutissmus*)又是广谱分布的赤潮藻，由它们引发的赤潮遍及世界几大洲的海域[18]。

叶绿素荧光研究作为植物光合作用研究的一个组成部分已有几十年的历史[13]，近年来由于应用上的需要和仪器上的不断更新，使得这一技术获得长足的发展，被称之为叶绿素荧光的"Renaissance"(文艺复兴)[13]。由于该技术的快捷简便，无伤害性和定量性，目前正被广泛地引入到诸多研究领域之中[6,14]。本文研究了两种赤潮藻的活体荧光特性，测定了它们的荧光光谱和 DCMU－增益荧光比率(F_D/F_N)，为把叶绿素荧光技术引入到我国赤潮发生机理研究领域作初步尝试。

收稿日期：1992－07－10

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 藻类材料

海洋原甲藻(*P.micans*)和微小角毛藻(*Ch.minutissmus*)均引自中国科学院海洋研究所.用 f/2 培养液(改良方法)[8]和全人工海水培养液在光照培养箱(LRH－150－G 型)内进行分批培养,箱内光强为[23(左方)+33(上方)+23(右方)]×10^2 Lu,光暗比(12 小时:12 小时).生长达到稳定期时,用无菌的 f/2 培养液定期转接,接种浓度分别为 10^4 ccll/ml(原甲藻)和 10^5 ccll/ml(角毛藻).

1.2 藻细胞数(N)－光密度(OD)关系图的确立

在显微镜下采用 0.1 ml 的藻类计数框进行全片(100 小格)计数或每片 5 小格的重复计数,以相差小于 15% 为有效.用 721 型分光光度计分别在 660 nm(对原甲藻)和 680 nm(角毛藻)处测定相应藻液的光密度,绘制 $N-OD$ 关系图.

1.3 温度及营养试验

对海洋原甲藻在 23 ℃ 至 34 ℃ 间共设 4 个实验温度,角毛藻则在 25 ℃ 至 44.5 ℃ 间设立 6 个实验温度.38 ℃ 以下的实验在光照培养箱中进行,其温度变动范围为 ±1 ℃,40 ℃ 以上的温度试验是通过恒温磁力搅拌水浴来进行的.

为取得无氮磷污染的样品,需先将生长在 f/2 培养液中的两种藻液离心(1000 ～ 1500 r/min, 10min),弃去上清液,用适当体积的 15 mg/L 的 $NaHCO_3$ 液悬浮和洗涤沉淀的藻体,重复上述过程两次,便可得到无氮磷污染的样品.

1.4 活体荧光的测定

用 Shimadzu RF－5 000 型荧光分光度计测定活体荧光光谱.以 685 nm 为检测波长,激发光波长扫描范围为 400 ～ 800 nm,记录藻体的荧光激发光谱;另选用 575 nm 为激发光波长,发射光波长扫描范围为 590 ～ 750 nm,记录藻的荧光发射光谱.在 3.0 ml 的藻液中加入 0.5 ml 10^{-4} mol/L 的 DCMU 海水溶液,在黑暗中保持 20 分钟后测定藻液的相对荧光强度(在 675 nm)即为增益荧光强度 F_D,另在 3.0 ml 藻液中加入 0.5 ml 的空白培养液作为对照,测得的荧光强度为正常荧光强度 F_N. F_D/F_N 代表该藻的 DCMU－增益荧光比率,它一定程度上反映了藻体的光合能力[19].

2 实验结果

2.1 藻细胞数(N)－光密度(OD)关系图

图 1 和图 2 是在本实验室条件下和一定的藻浓度范围内,经多次测定及统计回归处理而得到的海洋原甲藻和微小角毛藻的 $N-OD$ 关系图.

两种藻分属不同的门类(甲藻门和硅藻门),其大小,内含色素及运动性均不相同,叶绿素体内红光吸收峰的位置也有差别(分别为 660 nm 和 680 nm,活体吸收光谱文中未给出),故二者的 $N-OD$ 关系图各不相同,但均呈线性关系,由图中 OD 值可求出相应的藻细胞浓度.可以看出,相对于同一 OD 值,微小角毛藻的细胞数要比海洋原甲藻高出一个数量级.

维普资讯 http://www.cqvip.com

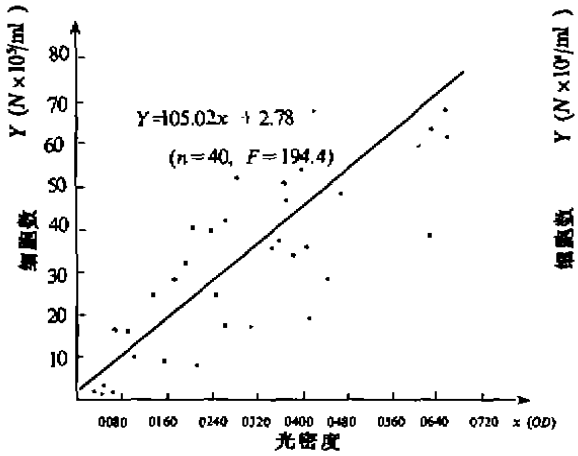


图 1　海洋原甲藻 (*P.micans*) 的 $N-OD$ 关系图
(25 ℃ 下培养)

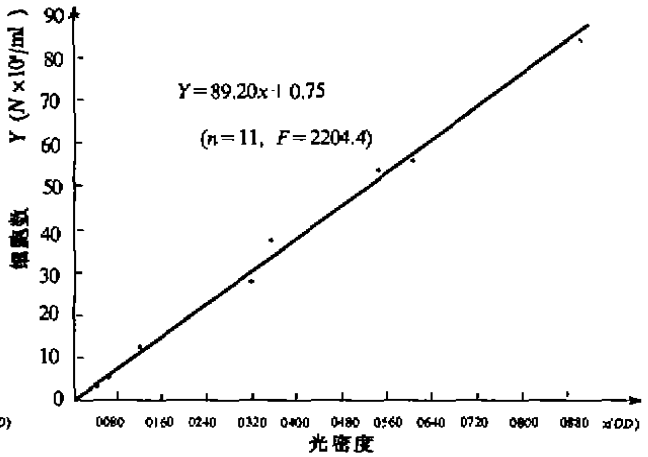


图 2　微小角毛藻 (*Ch. minutissimus*) 的 $N-OD$ 关系图
(25 ℃ 下培养)

2.2　温度对两种赤潮藻生长的影响

海洋原甲藻和微小角毛藻在不同温度下的生长状况如图 3 和图 4.

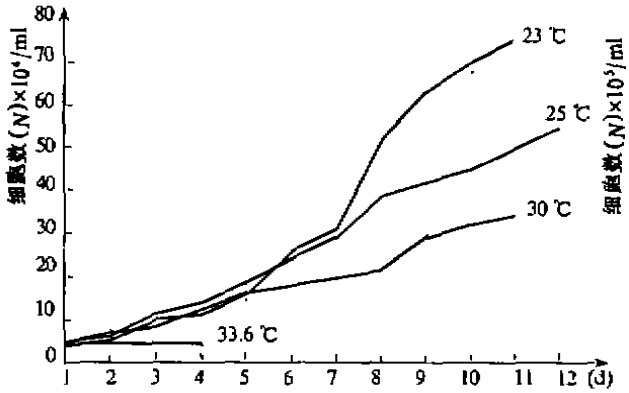


图 3　海洋原甲藻 (*P.micans*) 在不同温度下的生长状况

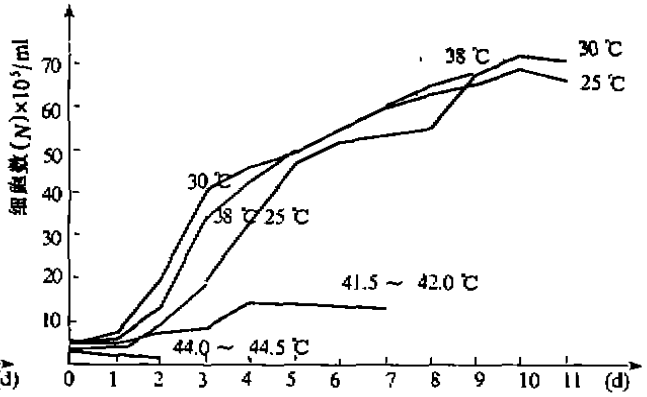


图 4　微小角毛藻 (*Ch. minutissimus*) 在不同温度下的生长状况

由图 3 看出，以 23 ℃ 下的生长状况为最佳，在接种 5 天后细胞浓度超过 30 ℃ 下的细胞浓度，7 天后则又超过 25 ℃ 下的细胞浓度，10 天后其细胞浓度为 25 ℃ 下的 1.5 倍，为 30 ℃ 下的 1.9 倍。当升温至 33 ℃ 与 34 ℃ 间培养时，两天后细胞数即下降，且多数细胞停止了运动，3 天后细胞严重变形或解体，说明原甲藻的耐热性较差，其生长温度上限在 33 ℃ 和 34 ℃ 之间.

角毛藻的生长最适温度较高，为 30 ℃ (或更高)，当温度上升到 38 ℃ 时仍能维持较高的增殖速率，至 42 ℃ 时生长状况恶化，在 44 ℃下细胞在 24 小时内全部死亡，故其生长上限温度应在42℃至 44 ℃ 之间.

2.3　缺氮和磷对两种赤潮藻增殖的影响

两种赤潮藻在改用全人工海水培养液进行培养时，生长态势良好，似不劣于 f/2 培养液时的状

维普资讯 http://www.cqvip.com

况.若在全人工海水培养液中除去氮或磷,两种藻的生长立即发生明显的变化,其生长速率下降,生长周期缩短,其状况如图5和图6.

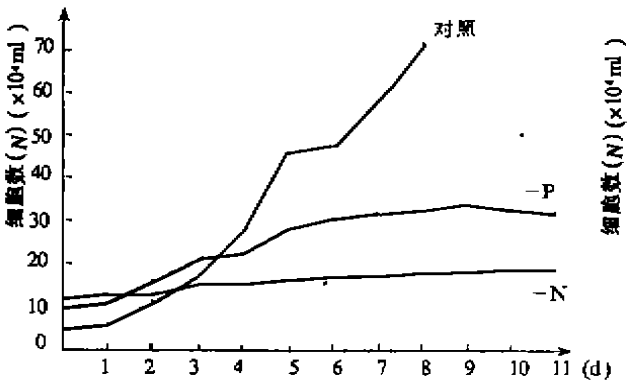


图5 缺氮和磷对海洋原甲藻(*P.micans*)生长的影响

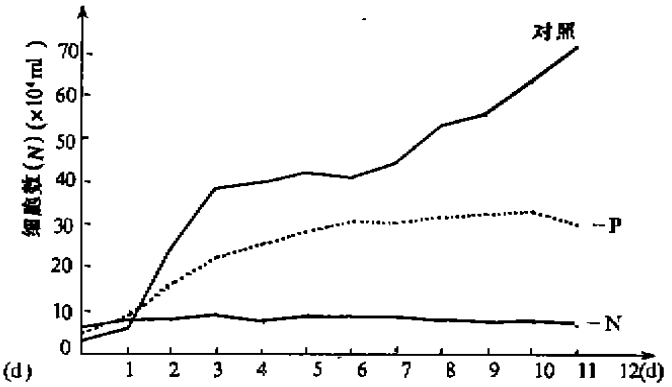


图6 缺氮和磷对微小角毛藻(*Ch. minutissus*)生长的影响

在全营养人工海水中培养8天后,两种藻的细胞数目仍在增长;而在缺氮或磷时细胞的增殖很快停止,从图中看,缺氮的影响要比缺磷大,在相同的培养时间内,缺氮培养下的藻细胞浓度总是比缺磷低.

2.4 两种赤潮藻的活体荧光特性

2.4.1 *活体荧光光谱* 图7中A、B分别为海洋原甲藻和微小角毛藻的荧光激发光谱,二者的峰值接近,约为580 nm.

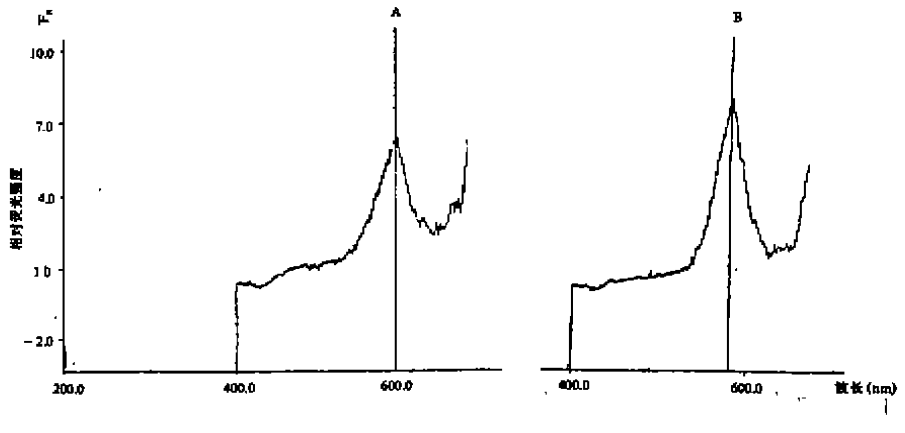


图7 两种赤潮藻的荧光激发光谱(检测光 λ=685 nm) A. 海洋原甲藻 B. 微小角毛藻

如用575 nm的绿黄光对两种藻进行激发,则得到图8之A、B所示的荧光发射光谱,其发射峰均位于675 nm,应代表两种藻体内叶绿素的荧光发射峰(左侧是水的拉曼峰).

维普资讯 http://www.cqvip.com

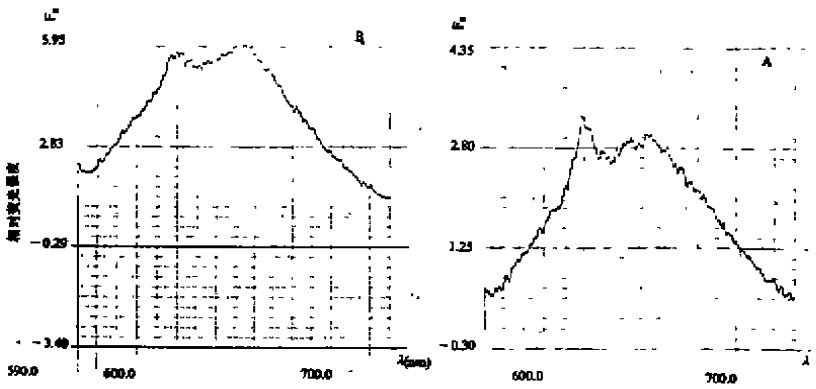


图 8　两种赤潮藻的荧光发射光谱(激发光 λ=575 nm)　A. 海洋原甲藻　B. 微小角毛藻

2.4.2　DCMU－增益荧光　光合电子传递抑制剂 DCMU(二氯苯二甲基脲)对两种藻的活体荧光有明显的增益作用，其中海洋原甲藻的表现更为突出，如图 9.

正常荧光(F_N，未加 DCMU)和 DCMU 增益荧光(F_D，加入 DCMU 后)的比率(F_D/F_N)称为 DCMU 增益荧光比率，是一个很有用的植物荧光参数，在一定程度上可以代表植物的光合能力.原甲藻的增益荧光比率为 2.5，而角毛藻的荧光比率较低(<2.0)，这一比率的确能反映藻的生理状态，如老化的原甲藻(培养 17 天)F_D/F_N 下降到 1.7，在 44 ℃ 热胁处理下的角毛藻的比率成为 1.0，即表示已没有荧光的增益，此时细胞可能已死亡.

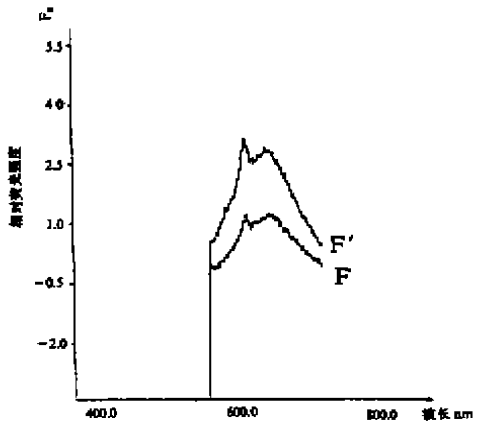


图 9　DCMU(5×10^{-4} mol/L)对海洋原甲藻(*P. micans*)荧光发射光谱的影响

F－对照　　F'－DCMU 处理

3　讨论

在本实验条件下测到的海洋原甲藻的生长最适温度为 23 ℃，这与 Amishi(1987)[8] 所报导的原甲藻赤潮发生时的水温相符，说明温度条件在赤潮发生中可能起关键性作用，在其他有关外界因子满足的情况下，温度的适宜与否就成为决定性因素.此外，属于硅藻门的角毛藻和属于甲藻门的原甲藻对温度的要求相差很大(达 10 ℃ 之多)，这不能不对它们在自然水体中的季节分布产生重大的影响，如报导珠江口甲藻的数量在水温处于 16 ℃ 至 26 ℃ 间时常高于 10^5 cell/m^3，但当水温上升至 28 ℃ 至 29℃ 时，就下降到 10^5 cell/m^3 之下[9].对深圳大鹏湾盐田水域的调查表明，含角毛藻的硅藻赤潮常发生在夏季，而甲藻所引起的赤潮却以春季为多.因此，对温度的不同要求是自然界藻类优势种群季

维普资讯 http://www.cqvip.com

节更迭的主要原因.

海洋中营养元素的富集常被认为是诱发赤潮的重要原因,其中氮磷更起着主要的作用[1].本研究结果表明,缺氮或磷限制两种赤潮藻的增殖,不仅生长减慢和停止,而且细胞变小,颜色变浅.在自然条件下,海洋表层的氮含量极低[15],可能成为浮游藻类增殖的限制因素.缺氮会引起叶绿素含量的下降和蛋白质(包括各种酶)的合成受阻,因而直接影响藻细胞内光合器的结构和功能,诸如色素蛋白复合体的构建[17]及光能转化及生长效率等[10].

两种赤潮的荧光激发光谱的高峰都在 580 nm 附近,说明该波长的光激发体内叶绿素荧光(685 nm)最有效,但两种赤潮藻分属不同的门类,它们所含有的主要捕光色素蛋白复合物(LHCP)各不相同,如甲藻类主要含 PCP (Pridinin－chlorophyll protein complex)[9]. 而硅藻含有 FCP (Chla－chlc－fucoxanthin protein complex)[4],两者的吸收峰也不相同,但它们的荧光激发光谱的高峰位置却很近似.这一现象还有待解释.荧光发射光谱都显示 675 nm 处的高峰,这应是体内叶绿素的荧光发射峰,但我们在许多大型海藻(包括绿藻、褐藻和红藻)中所测到的高峰都在 685 nm,且在 735 nm 处尚有一肩峰(待发表),因而与两种赤潮藻的荧光光谱有所不同.

作为光合电子传递抑制剂的 DCMU(二氯苯基二甲基脲)能阻断电子由 Q_B 向 PQ 的传递[13],从而导致光系统Ⅱ内电子接受体 Q_A 的最大还原,结果使叶绿素的荧光增强.F_D/F_N 值(增益荧光比率)代表藻的光合能力(或潜力),比率越高则光合能力越强,生理状态越佳.因而是一项有用的生理指标.由于测定上的方便,以荧光比率作为监测手段,进一步研究赤潮藻的光合能力与其增殖速率的关系,从而阐明海洋浮游藻类的光合作用在引发赤潮中所具有的重要意义.任何浮游藻类大规模的繁衍都必须有充足的物质和能量作为基础,而藻类的光合作用正是提供这种物质和能量的唯一源泉.因此,在对赤潮发生机理的探讨中应该加强对各种赤潮藻类光合作用的比较研究.

参考文献

1 齐雨藻等. 中国沿海赤潮－深圳海域富营养化与赤潮研究. 暨南大学学报(自然科学), 1989, 赤潮研究专刊: 10～21.

2 武宝玕. 抑制光合作用型除莠剂对光合系统的作用机制. 植物生理学通讯, 1983, 4: 14～20.

3 林永水. 珠江口甲藻生态及赤潮初步研究. 暨南大学学报(自然科学), 1989, 赤潮研究专刊: 22～31.

4 Alberte R S. Light－harvesting system of brown alga and diatom. Isolation and characterization of chlorophyll a/C and chlorophyll a/fucoxanthin pigment－protein complexes. Biochim Biophys Acta, 1981, 635: 304～316.

5 Amishi T. 赤潮. 世界环境, 1987, 2: 29～31.

6 Ernst D, et al. Application of chlorophyll fluorescence in hydrobiology. In: Application of Chlorophyll Fluorescence. Lichtenthaler, H. K.(ed). Kluwer Academic Publisher. 1988. 261～268.

7 Fukazawa N, et al. A mechanism of 'red tide' formation I. Growth rate estimate by DCMU－induced fluorescence increase. Mar Ecol Prog Ser, 1980, 3: 217～222.

8 Guillard R R L, Pyther J H. Studies of marine planktonic diatom. I. *Cyclotella nana Hustedt* and *Detonula confervacea* (Cleve) *Gran*. Can J Microbiol, 1962, 8: 229～239.

9 Haxo F T, et al. Peridinit－chlorophyll a proteins of the dinoflagellate *Amphidinium carterae* (Plymouth 450). Plant Physiol, 1976, 57: 297～303.

维普资讯 http://www.cqvip.com

10 Herzing R, Falkowski P G. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana*(Haptophyceae). I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. J Physol, 1989, 25: 462 ～ 471.

11 Iwasaki H. Recent progress of red tide studies in Japan: An overiew. In: red Tides, Biology, Environmental Science, and Toxicology. Okaichi T, Anderson D M, Nemoto T(ed). Elsevier, 1989. 3 ～ 9.

12 Kautsky H, Hirsch A. Neue versuche zür kohlensa ureassimilation. Naturwissenschaften, 1931, 19: 964.

13 Kooten O V, Snel F H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature. in plant stress physiology. Photosynthesis Research, 1990, 25: 147 ～ 150.

14 Lichtenthaler H K. In vivo chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. In: Application of Chlorophyll Fluorescence. Lichtenthaler, H. K.(ed) Kluwer Academic Publisher. 1988. 129 ～ 142.

15 McCarthy J J. Nitrogen. In: Physiological Ecology of Phytoplankton. Morris I. (ed). Blackwell Scientific Publication. 1980. 191 ～ 195.

16 Parsons T R, et al. A manual of Chemical and Biological Method for Seawater Analysis. Pergaman Press. 1984. 107 ～ 112.

17 Plumley F G, et al. Nitrogen－dependent biogenesis of chlorophyll－protein complexes. In: Photosynthesis. Alan R liss, Inc 1989. 331 ～ 339.

18 Sampayo M A De M. Red tides off the Portuguese coast. In: Red tides, Biology, Environmental Science and Toxicology. Okaichi T. Anderson D M, Nemoto T (ed). Elsevier, 1989. 89 ～ 92.

19 Samuelsson G, Oquist G. A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on in vivo chlorophyll fluorescence. Physiol Plant. 1977, 40: 315 ～ 319

STUDIES ON RESPONSES TO TEMPERATURE, NUTRIENTS AND THEIR IN VIVO FLUORESCENCE PROPERTIES OF TWO RED TIDE SPECIES

Wu Baogan　Jiang Haiyin　Qi Yuzao

(Institute of Hydrobiology)

ABSTRACT

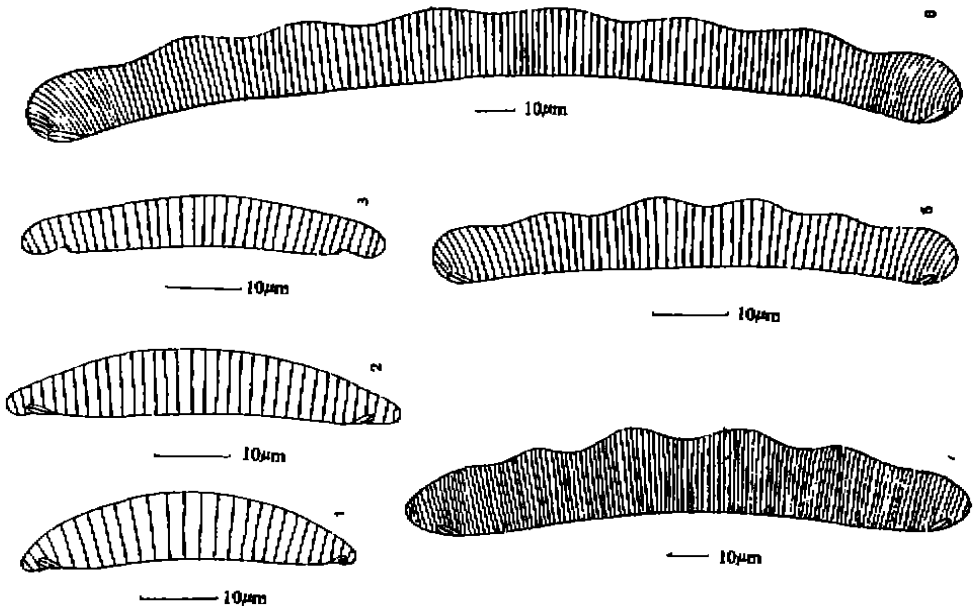
The effects of temperature and nutrients (N, P) on the growth of two red tide species were investigated under batch cultural conditions. It was found that the optimal temperature for the growth of *Prorocentrum micans* was 23 ℃, the upper temperature limit was 33 ℃ ～ 34 ℃. The growth optimal temperature for *Chaetoceras minutissmus* was above 30 ℃, the upper temperature limit was 42 ℃ ～ 44 ℃. So the temperature respons of two algae were quite different. Nitrogen and phosphorus deficiency prevented the growth of these species and shorten their life cycle. Lack of N had more profound influence than P deficiency. In addition, the in vivo fluorescence properties of these two algae were studied. The excitation and emission spectra were recorded, the maximum wavelength for these two spectra were at 580 nm and 675 nm respectively. Adding DCMU(an inhibitor of photosynthetic electron transfer) enhanced chlorophyll fluorescence of two species. The

(下转第 83 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

obtusiuscula (Grun.) Cleve－Euler, *E. monodon* var. *undulata* Hust. and *E. maior* var. *undulata* Berg.

KEYWORDS: *Eunotia* Ehr; new species; new records



附图　1, 2　海南短缝藻　新种　*Eunotia hainanensis* Zang et Qi, sp. nov.
3　维纳短缝藻钝形变种　*Eunotia veneris* var. *obtusiuscula* (Grun.) Cleve－Euler
4　单峰短缝藻波缘变种　*Eunotia monodon* var. *undulata* Hust.
5, 6　巨大短缝藻波缘变种　*Eunotia maior* var. *undulata* Berg.

(上接第 34 页)

DCMU－enhanced fluorescence ratio was measured, the F_D/F_N value for *P. micans* was 2.5 while this value was usually lower than 2.0 for *Ch. minutissmus*. The F_D/F_N ratio was suggested to be a physiological index in red tide research.

KEYWORDS: red tide; temperature; nitrogen and phosphorus; fluorescence properties in vivo